

PCT/JP2004/010090

日 本 国 特 許 庁

08.07.2004

JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類は下記の出願書類の謄本に相違ないことを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 7月 8日

出 願 番 号
Application Number: PCT/JP03/08681

出 願 人
Applicant (s): 科学技術振興事業団
竹田 潤二
堀江 恭二

REC'D 19 AUG 2004

WFO

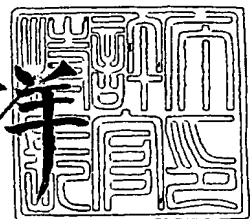
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 8月 5日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



出証平 16-500303

BEST AVAILABLE COPY

受理官庁用写し

1/5

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2003年07月07日 (07.07.2003) 月曜日 15時52分53秒

KJ004PCT

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号	PCT/JP03/08631
0-2	国際出願日	08.07.03
0-3	(受付印)	PCT International Application 日本国特許庁
0-4	様式-PCT/RO/101 この特許協力条約に基づく国際出願願書は、 0-4-1 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.04.2003)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	KJ004PCT
I	発明の名称	トランスジェニック生物を作製する方法およびシステム
II	出願人	
II-1	この欄に記載した者は	出願人である (applicant only)
II-2	右の指定国についての出願人である。	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-4ja	名称	科学技術振興事業団
II-4en	Name	JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION
II-5ja	あて名:	332-0012 日本国 埼玉県 川口市 本町4丁目1番8号
II-5en	Address:	4-1-8, Honcho Kawaguchi-shi, Saitama 332-0012 Japan
II-6	国籍(国名)	日本国 JP
II-7	住所(国名)	日本国 JP
II-8	電話番号	048-226-5601
II-9	ファクシミリ番号	048-226-5651

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2003年07月07日 (07.07.2003) 月曜日 15時52分53秒

III-1	その他の出願人又は発明者	
III-1-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-1-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-1-4j a	氏名(姓名)	竹田 潤二
III-1-4e n	Name (LAST, First)	TAKEDA, Junji
III-1-5j a	あて名:	565-0871 日本国 大阪府 吹田市 山田丘 2-2 大阪大学大学院医学系研究科内
III-1-5e n	Address:	c/o Osaka University, Graduate School of Medicine 2-2, Yamadaoka Suita-shi, Osaka 565-0871 Japan
III-1-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-1-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-2	その他の出願人又は発明者	
III-2-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-2-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-2-4j a	氏名(姓名)	堀江 恭二
III-2-4e n	Name (LAST, First)	HORIE, Kyoji
III-2-5j a	あて名:	565-0871 日本国 大阪府 吹田市 山田丘 2-2 大阪大学大学院医学系研究科内
III-2-5e n	Address:	c/o Osaka University, Graduate School of Medicine 2-2, Yamadaoka Suita-shi, Osaka 565-0871 Japan
III-2-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-2-7	住所 (国名)	日本国 JP
IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名	代理人 (agent)
	下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。	
IV-1-1ja	氏名(姓名)	山本 秀策
IV-1-1en	Name (LAST, First)	YAMAMOTO, Shusaku
IV-1-2ja	あて名:	540-6015 日本国 大阪府 大阪市 中央区城見一丁目2番27号 クリスタルタワー15階
IV-1-2en	Address:	Fifteenth Floor, Crystal Tower, 2-27, Shiomi 1-chome, Chuo-ku Osaka-shi, Osaka 540-6015 Japan
IV-1-3	電話番号	06-6949-3910
IV-1-4	ファクシミリ番号	06-6949-3915

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2003年07月07日（07.07.2003）月曜日 15時52分53秒

KJ004PCT

IV-2	その他の代理人	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with same address as first named agent) 安村 高明; 森下 夏樹 YASUMURA, Takaaki; MORISHITA, Natsuki	
IV-2-1ja IV-2-1en	氏名 Name(s)		
V	国の指定		
V-1	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国であ る他の国 EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国で ある他の国 EP: AT BE BG CH&LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL PT RO SE SI SK TR 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国で ある他の国 OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG 及びアフリカ知的所有権機構と特許協力条約の締約 国である他の国	
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NI NO NZ OM PG PH PL PT RO RU SC SD SE SG SK SL SY TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN YU ZA ZM ZW	
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて 、規則4.9(b)の規定に基づき、 特許協力条約のもとで認められ る他の全ての国の指定を行う。 ただし、V-6欄に示した国の指 定を除く。出願人は、これらの 追加される指定が確認を条件と していること、並びに優先日か ら15月が経過する前にその確認 がなされない指定は、この期間 の経過時に、出願人によって取 り下げられたものとみなされる ことを宣言する。		
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)	
VI	優先権主張	なし (NONE)	
VII-1	特定された国際調査機関 (ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)	
VIII	申立て	申立て数	
VIII-1	発明者の特定に関する申立て	-	
VIII-2	出願し及び特許を与えられる国 際出願日における出願人の資格 に関する申立て	-	
VIII-3	先の出願の優先権を主張する国 際出願日における出願人の資格 に関する申立て	-	
VIII-4	発明者である旨の申立て (米国 を指定国とする場合)	-	
VIII-5	不利にならない開示又は新規性 喪失の例外に関する申立て	-	

特許協力条約に基づく国際出願願書

KJ004PCT

原本（出願用） - 印刷日時 2003年07月07日（07.07.2003）月曜日 15時52分53秒

IX	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
IX-1	願書（申立てを含む）	5	-
IX-2	明細書（配列表を除く）	92	-
IX-3	請求の範囲	8	-
IX-4	要約	1	EZABST00.TXT
IX-5	図面	13	-
IX-7a	国際出願に含まれる用紙の枚数 （明細書の配列表を除く）	119	
IX-6	明細書の配列表	21	-
IX-7	合計	140	
	添付書類	添付	添付された電子データ
IX-8	手数料計算用紙	✓	-
IX-9	個別の委任状の原本	✓	-
IX-16	コンピュータ読み取り可能なヌクレオチド又はアミノ酸配列表		
IX-16 (i)	規則13の3に基づき提出する 国際調査のための写し（国際 出願の一部を構成しない）	-	1 フレキシブルディスク
IX-17	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
IX-18	その他	納付する手数料に相当する 特許印紙を貼付した書 面	-
IX-18	その他	陳述書	-
IX-18	その他	フレキシブルディスクの 記録形式等の情報を記載 した書面	-
IX-19 ~	要約書とともに提示する図の 番号		
IX-20	国際出願の使用言語名:	日本語	
X-1	提出者の記名押印		
X-1-1	氏名(姓名)	山本 秀策	
X-2	提出者の記名押印		
X-2-1	氏名(姓名)	安村 高明	
X-3	提出者の記名押印		
X-3-1	氏名(姓名)	森下 夏樹	

受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	08.07.03
10-2	図面:	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であってその後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）	

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2003年07月07日（07.07.2003）月曜日 15時52分53秒

10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

明細書

トランスジェニック生物を作製する方法およびシステム

5

技術分野

本発明は、細胞に外来核酸分子を導入するためのシステム、キット、組成物に関する。より詳細には、トランスジェニック生物の作製およびそのための組成物、キット、システムなどに関する。

10

背景技術

トランスジェニック生物は、その応用の範囲の広さから、現在非常に注目されている技術である。しかし、効率よくトランスジェニック生物を作製する方法は、それほど開発されておらず、そのようなトランスジェニック生物の効率よい作製方法の開発は注目されている。

15

最近、トランスポゾンがトランスジェニック生物の作製に応用することが試みられている。トランスポゾン（または、転移可能（*transposable*）エレメントとも呼ばれる）は、反復配列が並んだ核酸分子または配列である。トランスポザーゼは、ある核酸分子への別の核酸の挿入を促進する酵素である。通常、トランスポザーゼは、トランスポゾンの中にある。

20

トランスポゾンは、比較的広範な範囲の生物から見出されており、その現象は普遍的であると考えられている。転位はカット&ペースト形式により行われるとされている。脊椎動物でもトランスポゾンが発見されており（Radice, A. D. ら、1994. *Mol. Gen. Genet.* 244, 606-612）、*Tc1/mariner*、*hAT*（*hobo*/*Ac*/*Tam*）などの

25 スーパーファミリーに属するトランスポゾンが種々の生物（例えば、魚類、両生類、哺乳動物を含む）から同定されている（Oosumi et al., 1

995. Nature 378, 873; Ivics et al., 1995. Mol. Gen. Genet. 247, 312-322; Koga et al., 1996. Nature 383, 30; Lam et al., 1996. J. Mol. Biol. 257, 359-366、および Lam, W. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 10870-10875)。トランスポザーゼは、トランスポゾンのもとあった位置からの切除および再組み込みを触媒または促進することが知られている (Plasterk, RHA., 1999, TIG 15: 326-332; Plasterk RHA., 1996 Curr. Top. Microbiol. Immunol. 204, 125-143)。トランスポゾンの自律メンバーは、トランス作用性因子である活性トランスポザーゼを発現することができることから、自分自身が転位可能であるという性質も有する。非自律エレメントは、シス作用性因子であり得、この場合逆方向末端反復配列とも呼ばれる。一部の逆方向反復配列は、1または複数の直列反復配列を含む。このような配列は、末端逆方向反復配列 (IRs) 中に埋め込まれており、相補性トランスポザーゼの存在下で別のエレメントからの移動の用いられ得る。

このような系を用いて種々の生物において外来遺伝子の導入が試みられている。

植物では、Ac/Ds、Spmスーパーファミリーなどの転位可能エレメントが利用されており、すでに慣用的な技術となっている (Osborne and Baker, 1995 Curr. Opin. Cell Biol. 7, 406-413)。動物でもまた、近年になって試みが行われている。ただし、エレメントには種特異性があり、なかなかうまくいかないことが多いといわれている。非ショウジョウバエ昆虫、ゼブラフィッシュ、哺乳動物などの細胞の遺伝子形質転換のための *Drosophila melanogaster* の P エレメントトランスポゾンの利用の試みはうまくいっていない (Handl

er et al., 1993. Arch. Insect Biochem. Physiol. 22, 373-384; Gibbs et al. 01. Mar. Biol. Biotech. 3, 317-326; および Rio et al., 1988 J. Mol. Biol. 200, 411-415)。そこで、

5. Tc1/marinerスーパーファミリーに属するメンバーが種特異性をほとんど要求しないことから現在注目されており、ヒトなどの哺乳動物にまで応用が試みられている。このうち、Minos、TcEなどもその応用が試みられている。

- 10 Sleeping Beauty (SB) は、分子系統分類データーを利用してサケ型Tc1様トランスポゾン (SB) の転位を促進する活性として特定された。推定トランスポザース遺伝子の共通配列はまず8種類の魚由来のサケサブファミリー要素の不活性要素から推定し、そしてこのような要素を不活性にする変異を排除することにより操作されている。トランスポザースを構築し、その機能性ドメインを同定し、そして生化学的機能を個別におよび全長トランス
- 15 スポザースの観点から試験した。トランスポザースはサケ要素の逆方向反復配列内の2つの結合部位に結合し、そして基質特異性があり、そのことは近縁な魚類要素サブファミリー間での交差移動を阻止できうる。SBトランスポザースは魚類のみでなく、マウスおよびヒト細胞における操作トランスポゾンの染色体組込みを有意に高める。トランスポザースにおける特異的なモチーフのため
- 20 の要件および標的トランスポゾン内の特異的な配列は、魚類および哺乳動物細胞等における活性と共に、SBトランスポザースを脊椎動物における生殖系形質転換および挿入式変異誘発のための最初の活性DNAトランスポゾンシステムとして確立する。本発明の一の観点において、本発明は核酸フラグメントであって：少なくとも2つの逆方向反復配列の間に位置する核酸配列を含んで
- 25 成り、その逆方向反復配列がSBタンパク質に結合でき、そしてその核酸フラグメントが細胞中のDNAは組込まれることのできる核酸フラグメントに関連

する。一の態様において、細胞は動物、例えば無脊椎動物または脊椎動物から入手する。好適な無脊椎動物には甲殻類または軟体動物、例えば限定することなく、エビ、ホタテ、ロブスター、ハマグリまたはカキが含まれる。好適な脊椎動物の態様には魚類、鳥類、ならびに哺乳動物、例えばマウス、有蹄類、ヒツジ、ブタおよびヒトから成る群より選ばれるものが挙げられる。細胞のDNAは細胞ゲノムまたは染色体外DNA、例えばエピソームまたはプラスミドであってよい。

DNAを細胞に導入するための方法は知られており、例えば、DNA凝縮試薬（例えばリン酸カルシウム、ポリエチレングリコール等）、脂質含有試薬（例えばリポソーム、多重層小胞体など）およびウイルス媒介法などがある。これらの方法は全てそれ自身の制約をもつ。例えば、DNA凝縮試薬およびウイルス媒介法には、サイズが限定されるという欠点がある。核酸量もまた制約される。導入核酸の組み込みの促進もまた効率がよいというわけではない。

細胞にDNAを導入するための新しい方法、特に細胞の核酸の中への様々なサイズの核酸フラグメントの効率的な組込み、特に細胞のゲノムへのDNAの組込みを促進する方法のニーズが残っている。

Z. Ivics et al.; Cell, 91:501-510 (1997) は、培養細胞でのトランスポゾンシステムの発現を報告しており、成熟した哺乳動物個体またはその臓器、器官等ではトランスポゾンシステムの効果は確認されていない。動物細胞においては、ショウジョウバエの亜種 *Drosophila mauritiana* から *mariner* トランスポゾンが単離され、これを用いてベクターが構築されている。

例えば *Drosophila melanogaster* のP因子トランスポゾンを用いて種々の異種生物染色体DNAへの組み込みが試みられたが、種特異性の理由から、P因子ベクターの機能は維持されなかった。 *Drosophila* 以外のイエバエ、ハヤトビバエ、ノミバエなどのハエを用いた実験で

は、いずれの場合もP因子の転位活性が維持されなかった (Handler et al.; Arch. Insect Biochem Physiol., 22: 373-384 (1993)). P因子およびリポーター遺伝子が組み込まれたトランスジェニックゼブラフィッシュは、遺伝的に安定した発現が得られ
5 なかった (Gibbs et al.; Mol. Mar. Biol. Biotech., 3: 317-326 (1994)). 最も研究された真核生物トランスポゾンであるTc1/marinerトランスポゾンを異種生物で用いた場合、それらの種特異性は比較的強く転位が起こり易いことが知られている (Z. Ivics et al. Cell, 91: 501-510 (1997)). この
10 Tc1/mariner-likeトランスポゾンより再構築されるトランスポゾンおよびトランスポザーゼを含むトランスポゾンシステムの例に、SBトランスポゾンおよびSBトランスポザーゼを含む前記Sleeping Beauty (SB) transposon systemがある。このSBトランスポゾンをヒトのHeLa細胞およびマウスのLMTK細胞へ導入した例
15 (Z. Ivics et al.; Cell, 91: 501-510 (2000))、マウスの胚性幹 (embryonic stem: ES) 細胞へ導入した例 (α Luo. et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 10760-10773 (1998))・ヒト培養細胞に導入した線虫 (Caenorhabditis elegans) 由来Tc1トランスポゾンに活
20 性がみられた例 (G. Schouten et al. Nucleic Acids Res., 26: 3013-3017 (1998)) が報告されている。しかしながら、例えばマウスの胚性幹細胞へSBトランスポゾンを導入した上記例においては、トランスポゾンの転位頻度は外来遺伝子が導入された細胞あたり最大でも1世代の1細胞当たり 3.5×10^{-5} 回と極めて低く、所望の細胞
25 を得るためには大量の細胞を扱う必要があった。また、ヒトHeLa培養細胞に導入した例は、動物個体には適用できない。哺乳動物におけるトランスポ

ゾンの導入については、SBトランスポゾンおよびSBトランスポザーゼ遺伝子を体細胞ゲノム中に血液を介して導入して得られる。トランスポゾンが転位したマウス (SR Yant et al. Nature Genetics, 25:35-41

- 5 (2000)) が報告されている。しかしながら、この場合のトランスポゾン転位頻度は、該遺伝子が導入された肝臓細胞中わずか約5-6%であり、この方法では遺伝子導入の効率が悪く、系統的にトランスジェニック動物を得ることもできない。また、これまでの方法では、1動物個体の体内で数多くの遺伝子にランダムに変異を導入することが困難であり、その発現頻度も低いものであ
- 10 った。従って、遺伝子変異誘発のための一般的な方法を設計する必要があった。

従って、上述のように、これらのSBなどを用いても、細胞レベルで遺伝子を導入しようとした場合に、首尾よく行かない場合が多く、形質転換効率を上げることが課題となっている。

15

本発明は、形質転換効率をさらに上げるトランスポゾン系を開発し、トランスジェニック生物の生産をより効率よく行うことを課題とする。

発明の要旨

- 20 上記課題は、上記状況にかんがみ、鋭意研究を重ねた結果、部分的には、導入する核酸配列の少なくとも一部をメチル化することによって、予想外に形質転換効率が上昇したことを見出したことによって解決される。

- 本発明は、トランスポゾンを用いて外来遺伝子を効率よく細胞に導入する技
- 25 術に関する。より詳細には、本発明は、トランスポゾンを含む配列をメチル化することによって、トランスポゾンの転位活性を飛躍的に向上させ、効率よく

トランスジェニック生物を作製する技術に関する。メチル化は、ゲノムに組み込まれた後も保持されており、実際のゲノムへの遺伝子の組み込みにも利用することが可能になった。本発明を用いれば、従来のトランスポゾンを用いたトランスジェニック生物の作製方法よりも、格段に効率よく遺伝子を形質転換することができる。

従って、本発明は、以下を提供する。

(1) トランスポゾンをコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子であって、上記核酸配列は、少なくとも1つの核酸がメチル化されている、単離された核酸分子。

(2) さらに、所望の遺伝子をコードする核酸配列を有する、項目1に記載の単離された核酸分子。

(3) 上記メチル化は、少なくとも、CG配列におけるCにおいて存在する、項目1に記載の単離された核酸分子。

(4) 上記トランスポゾンはDNA型である、項目1に記載の単離された核酸分子。

(5) 上記トランスポゾンはTc1/mariner型に属する、項目1に記載の単離された核酸分子。

(6) 上記トランスポゾンはSleeping Beautyを含む、項目1に記載の単離された核酸分子。

(7) 上記所望の遺伝子は、上記トランスポゾンに作動可能に連結されるか、または細胞内に導入されると上記トランスポゾンに作動可能に連結され得る、項目2に記載の単離された核酸分子。

(8) 外来遺伝子を宿主内に導入するために使用される、項目1に記載の単離された核酸分子。

(9) 上記宿主は、真核生物を含む、項目8に記載の単離された核酸分子。

(10) 上記宿主は、哺乳動物を含む、項目8に記載の単離された核酸分子。

(11) 上記宿主は、げっ歯類を含む、項目8に記載の単離された核酸分子。

(12) 上記核酸分子が挿入されるゲノム上の位置においてトランスポザーゼが作用する、項目1に記載の単離された核酸分子。

5 (13) トランスポゾンにコードする核酸配列を有する遺伝子カセットであって、上記核酸配列は、少なくとも1つの核酸がメチル化されている、遺伝子カセット。

(14) トランスポゾンにコードする核酸配列、および所望の遺伝子をコードする核酸配列を有するベクターであって、上記核酸配列は、少なくとも1つ
10 の核酸がメチル化されている、ベクター。

(15) 上記メチル化は、少なくとも、CG配列におけるCにおいて存在する、項目14に記載のベクター。

(16) 上記トランスポゾンはDNA型である、項目14に記載のベクター。

(17) 上記トランスポゾンはTc1/mariner型に属する、項目1
15 4に記載のベクター。

(18) 上記トランスポゾンはSleeping Beautyを含む、項目14に記載のベクター。

(19) 上記所望の遺伝子は、上記トランスポゾンに作動可能に連結されるか、または細胞内に導入されると上記トランスポゾンに作動可能に連結され得
20 る、項目14に記載のベクター。

(20) 外来遺伝子を宿主内に導入するために使用される、項目14に記載のベクター。

(21) 上記細胞は、真核生物細胞を含む、項目20に記載のベクター。

(22) 上記細胞は、哺乳動物細胞を含む、項目20に記載のベクター。

25 (23) 上記細胞は、げっ歯類細胞を含む、項目20に記載のベクター。

(24) 上記核酸配列が挿入されるゲノム上の位置においてトランスポザー

5 5 ぜが作用する、項目 1 4 に記載のベクター。

(2 5) ゲノム上に挿入される外来核酸分子に対してトランスポザーゼを作用させるための組成物であって、上記組成物は、トランスポゾンにコードする核酸配列、および上記外来核酸分子を含み、上記トランスポゾンにコードする配列はメチル化されている、組成物。

(2 6) トランスポゾンにコードする核酸配列、および所望の遺伝子をコードする核酸配列を有する核酸分子を含む細胞であって、上記核酸配列は、少なくとも 1 つの核酸がメチル化されている、細胞。

10 (2 7) 上記メチル化は、少なくとも、CG 配列における C において存在する、項目 2 6 に記載の細胞。

(2 8) 上記トランスポゾンは DNA 型である、項目 2 6 に記載の細胞。

(2 9) 上記トランスポゾンは T c 1 / m a r i n e r 型に属する、項目 2 6 に記載の細胞。

15 (3 0) 上記トランスポゾンは S l e e p i n g B e a u t y を含む、項目 2 6 に記載の細胞。

(3 1) 上記所望の遺伝子は、上記トランスポゾンに作動可能に連結されるか、または細胞内に導入されると上記トランスポゾンに作動可能に連結される、項目 2 6 に記載の細胞。

20 (3 2) 外来遺伝子を宿主内に導入するために使用される、項目 2 6 に記載の細胞。

(3 3) 上記細胞は、真核生物細胞を含む、項目 2 6 に記載の細胞。

(3 4) 上記細胞は、哺乳動物細胞を含む、項目 2 6 に記載の細胞。

(3 5) 上記細胞は、げっ歯類細胞を含む、項目 2 6 に記載の細胞。

25 (3 6) トランスポゾンにコードする核酸配列、および所望の遺伝子をコードする核酸配列を有する核酸分子を含む組織であって、上記核酸配列は、少なくとも 1 つの核酸がメチル化されている、組織。

(37) 上記メチル化は、少なくとも、CG配列におけるCにおいて存在する、項目36に記載の組織。

(38) 上記トランスポゾン型はDNA型である、項目36に記載の組織。

5 (39) 上記トランスポゾンはTc1/mariner型に属する、項目36に記載の組織。

(40) 上記トランスポゾンはSleeping Beautyを含む、項目36に記載の組織。

10 (41) 上記所望の遺伝子は、上記トランスポゾンに作動可能に連結されるか、または細胞内に導入されると上記トランスポゾンに作動可能に連結される、項目36に記載の組織。

(42) 外来遺伝子を宿主内に導入するために使用される、項目36に記載の組織。

(43) 上記組織は、真核生物組織を含む、項目42に記載の組織。

(44) 上記組織は、哺乳動物組織を含む、項目42に記載の組織。

15 (45) 上記組織は、げっ歯類組織を含む、項目42に記載の組織。

(46) トランスポゾンをコードする核酸配列、および所望の遺伝子をコードする核酸配列を有する核酸分子を含む生物であって、上記核酸配列は、少なくとも1つの核酸がメチル化されている、生物。

20 (47) 上記メチル化は、少なくとも、CG配列におけるCにおいて存在する、項目46に記載の生物。

(48) 上記トランスポゾンはDNA型である、項目46に記載の生物。

(49) 上記トランスポゾンはTc1/mariner型に属する、項目46に記載の生物。

25 (50) 上記トランスポゾンはSleeping Beautyを含む、項目46に記載の生物。

(51) 上記所望の遺伝子は、上記トランスポゾンに作動可能に連結される、

項目 4 6 に記載の生物。

(5 2) 上記生物は、真核生物を含む、項目 4 6 に記載の生物。

(5 3) 上記生物は、哺乳動物を含む、項目 4 6 に記載の生物。

(5 4) 上記生物は、げっ歯類を含む、項目 4 6 に記載の生物。

5 (5 5) 上記所望の遺伝子は、上記生物に由来しない、項目 4 6 に記載の生物。

(5 6) トランスジェニック生物を作製するための方法であって、

A. トランスポゾンにコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子を提供する工程；

10 B. 上記核酸分子で、所望の生物の生殖細胞を形質転換する工程；

C. 上記生殖細胞において上記トランスポゾンにコードする核酸配列がメチル化している個体を選択する工程；

D. 形質転換された上記生殖細胞を用いて生物を再生する工程、を包含する、方法。

15 (5 7) 上記生物は、真核生物を含む、項目 5 6 に記載の方法。

(5 8) 上記生物は、哺乳動物を含む、項目 5 6 に記載の方法。

(5 9) トランスジェニック生物を作製するための方法であって、

A. トランスポゾンにコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子であって、上記核酸配列は、少なくとも 1 つの核酸分子がメチル化されている、

20 単離された核酸分子を提供する工程；

B. 上記核酸分子で、所望の生物の生殖細胞を形質転換する工程；ならびに

C. 形質転換された上記生殖細胞を用いて生物を再生する工程、を包含する、方法。

(6 0) 上記生物は、真核生物を含む、項目 5 9 に記載の方法。

25 (6 1) 上記生物は、哺乳動物を含む、項目 5 9 に記載の方法。

(6 2) 上記生物は、げっ歯類を含む、項目 5 9 に記載の方法。

(63) トランスジェニック生物を作製するためのキットであって、

A. トランスポゾンにコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子であって、上記核酸配列は、少なくとも1つの核酸分子がメチル化されている、単離された核酸分子；

5 B. トランスポザラーゼ、を包含する、キット。

(64) さらに、上記核酸分子およびトランスポザラーゼの使用法を記載する説明書を含む、項目63に記載のキット。

(65) トランスポゾンにコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子であって、上記核酸配列は、少なくとも1つの核酸がメチル化されている、
10 単離された核酸分子の、トランスジェニック生物の作製のための使用。

図面の簡単な説明

図1は、一過性トランスポゾン切り出しアッセイの結果を示す。

15 図2は、マウスゲノムの同一遺伝子座にメチル化または非メチル化のトランスポゾンにコードする核酸配列を有する細胞の樹立の様子を示す図である。aは、例示的実験のフローチャートを示す。bは、サザンブロット分析を示す。c～dは、メチル化の維持を確認する実験結果例である。

20 図3は、マウスゲノムにおける、DNAメチル化のトランスポゾン切り出し反応への効果を示す一例である。

図4は、トランスポゾンのゲノムへの挿入に及ぼす効果を示す例である。aは、例示的に使用されるプラスミド構成を示す。bにおいて、左は非メチル化
25 および右はメチル化のものを示す。

図5は、代表的なトランスポゾンの配列のアラインメントである。X01005(1
~1610)、Z29098(15~1787)、Z29102(15~1787)、U11641
(188~1451)、U11652(146~1442)、L48685(1~1455)
のマルチプルアライメント [丸括弧内の数字は、各登録番号の配列における塩
5 基範囲を示す]。

図中、「GFP」はGFP遺伝子を意味する。本明細書では、ときに、Sleeping Beauty (SB) トランスポゾンシステムにおけるトランスポ
10 ズンはSBトランスポゾン、トランスポザーゼはSBトランスポザーゼと記載
される。一方、図中においては、「SB」はSleeping Beautyト
ランスポザーゼ遺伝子を意味する。

(配列表の説明)

- 配列番号1 : SB (Sleeping Beauty) トランスポゾンDNA
15 の配列 (GENBANK登録番号L48685)。
配列番号2 : SBトランスポザーゼの核酸配列。
配列番号3 : SBトランスポザーゼのポリペプチド配列。
配列番号4 : 左外側反復の核酸配列。
配列番号5 : 左内側配列の核酸配列。
20 配列番号6 : TgTP-1Uの核酸配列。
配列番号7 : TgTP-2Lの核酸配列。
配列番号8 : TgTP-2Uの核酸配列。
配列番号9 : TgTP-3Lの核酸配列。
配列番号10 : Caenorhabditis elegans 由来の転移性
25 要素Tc1の核酸配列 (GENBANK登録番号X01005)。
配列番号11 : Caenorhabditis elegans 由来の転移性

要素Tc1のアミノ酸配列 (GENBANK登録番号X01005)。

配列番号12: *Drosophila hydei* 由来のMinos-2の核酸配列 (GENBANK登録番号Z29098)。

5 配列番号13: *Drosophila hydei* 由来のMinos-2のアミノ酸配列 (GENBANK登録番号Z29098)。

配列番号14: *Drosophila hydei* 由来のMinos-3の核酸配列 (GENBANK登録番号Z29102)。

配列番号15: *Drosophila hydei* 由来のMinos-3のアミノ酸配列 (GENBANK登録番号Z29102)。

10 配列番号16: *Haematobia irritans* 由来のHi2 marinerの核酸配列 (GENBANK登録番号U11641)。

配列番号17: *Haematobia irritans* 由来のHi2 marinerのアミノ酸配列 (GENBANK登録番号U11641)。

15 配列番号18: *Chrysoperla plorabunda* 由来のmarinerの核酸配列 (GENBANK登録番号U11652)。

配列番号19: *Chrysoperla plorabunda* 由来のmarinerのアミノ酸配列 (GENBANK登録番号U11652)。

発明の実施の形態

20 以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞 (例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など、独語の場合の「ein」、「der」、「das」、「die」などおよびその格変化形、仏語の場合の「un」、「une」、「le」、「la」など、スペイン語に
25 おける「un」、「una」、「el」、「la」など、他の言語における対応する冠詞、形容詞など) は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むこと

が理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語および科学技術用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。

（用語の定義および説明）

以下に本明細書において特に使用される用語の定義を列挙する。

- 10 本明細書において「トランスポゾン」とは、染色体上のある部位から別の部位に移動（転位）し得る核酸分子または核酸配列をいう。代表的には、トランスポゾンは、DNAセグメント（DNA型トランスポゾン）である。DNA型トランスポゾンは、トランスポザアーゼにより活性化されて転位する。トランスポゾンとしては、例えば、SBトランスポゾン（Acc. No. L48685）
- 15 （配列番号1）、配列番号10～19に示す配列に含まれるものが挙げられるがそれらに限定されない。

- 本明細書において「トランスポザアーゼ」とは、トランスポゾンを認識してその配列を転位させる触媒活性を有する酵素をいう。トランスポザアーゼとしては、
- 20 例えば、SBトランスポザアーゼ（配列番号2、3）、配列番号10～19に示す配列に含まれるものなどに示されるものが挙げられるがそれらに限定されない。

- 本発明において、トランスジェニック生物に用いられるトランスポゾン配列およびトランスポザアーゼ遺伝子は、内因性のものでも外来性のものでも制限なく使用することができるが、好ましくは外来性のトランスポゾン配列およびトランスポザアーゼ遺伝子を用いることができる。
- 25

トランスポゾンとは、通常両末端に反復配列（以下、本明細書では「トランスポゾン配列」という）を有し、これがトランスポザアーゼの認識部位である。該トランスポゾン配列は、トランスポザアーゼの作用により転位可能であれば、不完全な繰り返し部分を含み得るトランスポゾンが挿入されるDNA中の、トランスポゾンに特有な長さの挿入認識サイトは標的配列と呼ばれる。例えばSleeping Beauty (SB) トランスポゾンシステム (Z. Ivics, et al. Cell 91: 501-510 (1997)) の場合、標的配列はTAであり、トランスポゾン挿入後の配列はTA-トランスポゾン-TAである。従って、本明細書では、トランスポゾン配列とは、トランスポザアーゼにより認識され、目的となる生物において転位可能な天然または人工トランスポゾンの任意の配列を包含する。

トランスポゾンの標的配列としては、例えばTA、ATAT、TATATA、TACAなどが知られている。これらの課題は、本発明においてトランスポゾンをメチル化することによって達成された。

トランスポゾンには、主に自らの転位を触媒できる活性な酵素トランスポザアーゼを内部にコードしている自己完結型と、トランスポザアーゼ活性を欠損した非自己完結型とがある。トランスポゾン配列またはトランスポザアーゼ遺伝子を各々有する生物を交配させて、トランスポゾン配列およびトランスポザアーゼ遺伝子を有する生物を得る場合、あるいは、転位が固定されたトランスポゾン配列を有する（トランスポザアーゼ遺伝子を含まない）生物を得る場合、非自己完結型のトランスポゾンを用いる。トランスポゾンおよびトランスポザアーゼを両方含む生物またはシグニチャー部位を含みトランスポゾンおよびトランスポザアーゼ遺伝子を含まない生物を得る場合、自己完結型、非自己完結型の両方のトランスポゾンが利用できる。自己完結型トランスポゾンは、後述するCre-loxPシステムを用いて、即ちloxP配列をトランスポザアーゼ遺伝子の両側に有する生物とCreを有する非生物を交配することによりトランスポザアーゼ

を切り出すことで、非自己完結型に変換することができる。さらに、トランス
ポゾンには宿主依存型のものと宿主非依存型のものがあり、これらをいずれも
用い得る。一般的には宿主非依存型のものを用い得る。

5 本発明においては、トランスポゾンおよびトランスポザース遺伝子を含むト
ランスポゾンシステムよりトランスポゾンのみおよび／またはトランスポザ
ースのみを切り出して用いるか、またはトランスポザースを不活性化させて、ト
ランスポゾンを非自己完結型として用い得る。本発明の実施に有用なトランス
ポゾンシステムは、生物細胞で転位可能な任意の配列を包含するものであり、
好ましくは、marinerスーパーファミリーのメンバーを用い得る。例と
10 して、Tc1、SB、Minos、Txx、Tc3等のトランスポゾンファミ
リ、Caenorhabditis elegans、Mos1、Hyal
ophora cecropia等のmarinerトランスポゾンファミ
リ・Pogo・Tigger、4等のPogoトランスポゾンファミリーが挙
げられる (RH Plasterk et al.; Trends in ge
15 netics, 15: No. 8: 326-332 (1999))。最も好ましく
は、SB (Sleeping Beauty)。トランスポゾンをを用い得る。非
自己完結型トランスポゾンは、自己完結型トランスポゾンのトランスポザース
遺伝子を除去または不活性化することにより得ることができる。

20 本明細書において「DNA型」トランスポゾンとは、DNAの転位を行うト
ランスポゾンをいう。通常のトランスポゾンは、DNA型である。代表
的な実施形態では、本発明は、DNA型トランスポゾンを利用して実施される。

本明細書において、「Tc1/mariner型トランスポゾン」とは、Tc
1/marinerに類似したトランスポゾンをいう。Tc1/marine
r型に属するトランスポゾンとしては、例えば、Minos、SB、Tc1、
25 marinerなどが挙げられるがそれに限定されない。このスーパーファミ
リは、脊椎動物ゲノムが起源であるといわれている (Radiceら、19

94; Smit and Riggs, 1996 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1443-1448)。

本明細書において、「SB」または「Sleeping Beauty」とは、
Tc1/mariner型トランスポゾンであって、哺乳動物またはその細胞
5 においてトランスポゾン活性を有するものをいう (Ivics et al.,
Cell 91:501-510, 1997) をいう。

トランスポゾン配列に挟まれる部分には、様々なDNA配列 (例えば、マーカー遺伝子、遺伝子発現調節配列、所望の遺伝子など) を挿入することができ、
トランスポゾン配列の他に必要に応じて種々の構成要素を組み合わせたトラン
10 スポゾン構築物を構築することができる。本発明において、トランスポゾン構築物またはトランスポザーゼ遺伝子を導入する対象となる細胞は、生物 (好ましくは非ヒト生物) の個体に分化し得るポテンシャルをもつ細胞であればよく、
そのような細胞としては例えば幹細胞または受精卵がある。

本発明のトランスジェニック生物には、トランスポゾン構築物およびトラン
15 スポザーゼの一方または両方を含む founder (第1世代だけでなく、この founder を基に確立されるトランスジェニック生物の系統も当然に本発明に包含される。さらに、本発明のトランスジェニック生物系統由来の臓器 (器官)、組織、卵、精子、および受精卵、トランスジェニック生物の系統から確立される株化細胞、トランスジェニック生物の系統から作出される生物クロー
20 ン個体もまた本発明の範囲に含まれる。本発明のトランスポゾン構築物は、トランスポゾン配列の他に種々の構成要素を組み合わせて構築され、幹細胞または受精卵等に導入することができる。

本明細書において「メチル化」とは、核酸分子にメチル基を付加すること
いう。同様の効果があれば、メチル基は類似の基 (例えば、低級アルキル基)
25 などであってもよい。メチル化は、生体内ではメチル化酵素 (メチラーゼ) によって触媒される。ここでは、メチル基は、メチル基転移反応によって基質か

ら提供される。

1つの例示として、メチル基は5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸の酵素的還元により5-メチルテトラヒドロ葉酸として生成し、ホモシステインに一種のコバミド酵素の作用で転移しメチオニンが作られる。メチオニンはATPの作用によりS-アデノシルメチオニンになり、これがメチル供与体として種々のメチル化合物の生成に用いられる。コリンの酸化された形であるベタインなどもメチル供与体として働くことがある。各化合物に特異的なメチル基転移酵素が数十種明らかにされており、必要に応じて、適切なものを当業者は選択することができ、本発明において使用することができる。あるいは、メチル化は、酵素を用いるほかに、化学反応によって付加されてもよい。

本明細書においてメチル化の確認は、当該分野において公知の任意の技術を用いて行うことができる。そのような方法としては、例えば、メチル化による物理的挙動の変動の確認、重亜硫酸改変配列決定 (Bisulfite modified sequence) (Gitan RS, et al., Genome Res. Jan;12:158-64. 2002; Lilischkis R, et al. Diagn Mol Pathol. 2000;9:165-71.) が挙げられるがそれらに限定されない。

SBは、代表的に、各々の逆方向反復は少なくとも1の同方向反復を含む。本発明のこの態様の遺伝子転移システムは、それゆえ、2つの構成物：トランスポザーゼおよびクローン化された非自律性（即ち非自己挿入性）サケ科型因子またはトランスポゾン基質DNAの逆方向反復を有するトランスポゾンを含む。一緒にした場合、これら2つの構成物は活性なトランスポゾン活性を供する。

本明細書において、「逆方向反復配列」(inverted repetitive sequence) は、トランスポゾンにおいて作動する配列であって、構造上の特徴としては、両末端の15～40塩基対が逆方向に繰返しのある配列があることが多い。この逆方向反復配列は、挿入配列であり、転移因子のひとつである。各逆方向反復配列は好ましくは少なくとも一の直列反復配列

を含む（それ故、IR/DRと称される）。トランスポゾン要素は直鎖状フラグメントとして利用できる直鎖状核酸フラグメント（便宜上、5' 末端から3' 末端に至る）、または例えばプラスミドの中で環状のものであってよい。好適な態様において、各逆方向反復配列の中には2つの直列反復配列がある。

- 5 本明細書において好ましい逆方向反復配列としては、例えば、Tc1/mariner型トランスポゾン、SBトランスポゾンの逆方向反復配列が挙げられるがそれらに限定されない。これらの中で、SBに結合するものは、SBトランスポゾンの逆方向反復配列が挙げられるがそれらに限定されない。

- 10 本明細書において好ましい直列反復配列としては、例えば、Tc1/mariner型トランスポゾン、SBトランスポゾンの直列反復配列が挙げられるがそれらに限定されない。これらの中で、SBに結合するものは、SBトランスポゾンの直列反復配列が挙げられるがそれらに限定されない。

- 15 同方向反復は、代表的に、約25～約35塩基対の長さ、好ましくは約29～31塩基対の長さである。しかしながら、これにかかわらず、逆方向反復は、
20 唯一の同方向反復を含み得る。この場合、それは実際には反復でないが、以下により詳しく記載するように、共通の同方向配列に対して少くとも約80%の同一性を有するヌクレオチド配列である。トランスポゾン因子は、直鎖フラグメントまたは環状フラグメントとして、例えばプラスミドにおいて用いることができる（慣用的に、5' 末端から3' 末端に広がる）直鎖核酸フラグメントである。

- 25 トランスポゾンの好ましい実施形態において、各々の逆方向反復配列に2つの同方向反復がある。（この実施形態において4つになる）同方向反復は、類似したヌクレオチド配列を有し得る。この実施形態の核酸フラグメントの5' 側での逆方向反復は、代表的に、同方向反復（即ち左外側の反復）、介在領域、および第2の同方向反復（即ち左内側反復）を含む。この実施形態の核酸フラグメントの3' 側での逆方向反復は、同方向反復（即ち右内部反復）、介在領域、

および第2の同方向反応（即ち右外側反復）を含む。

それらは核酸フラグメント上で互いに対して逆に向いているので、核酸フラグメントの5' 逆方向反復内の同方向反復は、核酸フラグメントの3' 逆方向反復内の同方向反復と比べて逆方向にある。逆方向反復内の介在領域は、一般に、少くとも約150塩基対の長さ、好ましくは少なくとも約160塩基対の長さである。その介在領域は、好ましくは約200塩基対以下の長さ、より好ましくは約180塩基対以下の長さである。1つの逆方向反復の介在領域のヌクレオチド配列は別の逆方向反復中の介在領域のヌクレオチド配列と同様であってもそうでなくてもよい。

10 本明細書において使用され得るほとんどのトランスポゾン是完全な逆方向反復を有するが、SBタンパク質に結合する逆方向反復は、共通同方向反復と少くとも約80%の同一性、好ましくは共通同方向反復と約90%の同一性を有する。好ましい共通同方向反復は、SBトランスポゾンの配列のような配列が挙げられるがそれらに限定されない。

15 SBタンパク質のコア結合部位と仮定される部位は、配列番号3のN末端から123アミノ酸に存在する。ヌクレオチド同一性は、同方向反復と配列番号1などに記載される配列との間の相同性を行うことにより決定される。

SBタンパク質に結合する同方向反復配列の例としては、SBトランスポゾンの配列が挙げられるがそれらに限定されない。また、左外側反復の例としては、g t t g a a g t c g g a a g t t t a c a c t t a g gが挙げられるがそれらに限定されない。左内側反復としては、c c a g t g g g t c a g g a a g t t t a c a t a c a c t a a gが挙げられるがそれらに限定されない。右内側反復としては、左内側反復と類似する配列（例えば、90%以上の同一性）が挙げられるがそれらに限定されない。右外側反復としては、左外側反復配列と類似する配列（例えば90%以上の同一性）が挙げられるがそれらに限定されない。

逆方向反復は、ポリ（A）シグナルAATAAAを含んでいてもよい。このポリ（A）シグナルは、核酸フラグメント中に存在するコーディング配列により利用され得、ポリ（A）テールをmRNAに付加する。ポリ（A）テールのmRNAへの付加は、典型的には、ポリ（A）テールのない同じmRNAと比べてmRNAの安定性を増加させる。好ましくは、逆方向反復は、各々の逆方向反復配列中に2つの同方向反復を含む核酸フラグメントの3'側に存在する。

逆方向反復は、細胞内のDNAに挿入された核酸配列に隣接するようになる。核酸配列は、遺伝子のオープンリーディングフレームの全部または一部（即ちタンパク質をコードする遺伝子の部分）、単独でまたはオープンリーディングフレームの全部もしくは一部を伴う1または複数の発現調節配列（即ち核酸中の調節配列）を含み得る。好ましい発現調節配列には、これらに限らないが、プロモーター、エンハンサー、ボーダー調節因子、遺伝子座調節領域またはサイレンサーを含む。好ましい実施形態において核酸配列は、オープンリーディングフレームの少なくとも一部に作用可能に連結されたプロモーターを含む。

トランスポゾン¹⁵はトランスポザゼの存在下でDNA上の第一の位置から第二の位置へと移動できる（これを可動性ともいう）。任意の可動カットアンドペースト型トランスポゾンには2つの基本的な成分であり、それは活性トランスポザゼの起源と、トランスポザゼにより認識され、かつ、移動するDNA配列である。DNA配列の移動は認識されたDNA配列の間の介在核酸も移動²⁰することを可能にする。

本明細書において「外来遺伝子」とは、本発明の遺伝子転位によって導入されることが意図される遺伝子またはそれをコードする核酸分子をいう。そのような外来遺伝子は、導入が意図される宿主とは異なる起源のものであっても、その宿主由来であってもよい。また、導入が意図される限り、その外来遺伝子をコードする核酸配列は、どのようなタンパク質をコードするものであってもよい。そのような核酸配列によりコードされるタンパク質はマーカータンパク

質、例えばグリーン蛍光タンパク質（GFP）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、成長ホルモン（例えば遺伝子導入動物の成長を促進するもの） β -ガラクトシダーゼ（lacZ）、ルシフェラーゼ（LUC）、およびインスリン様増殖因子（IGF）などが挙げられるがそれらに限定されない。

トランスジェニック生物の一の実施形態において、タンパク質は細胞からの単離のための生成物である。バイオリアクターとしてのトランスジェニック生物公知である。タンパク質は、例えば、乳、尿、血液、体液、果実または卵の中で大量に生産され得る。乳、尿、血液、体液、果実または卵の中での発現を促進するプロモーターが知られている。そのようなものとしては、カゼインプロモーター、マウス尿性タンパク質プロモーター、 β -グロビンプロモーターおよびオボアルブミンプロモーターが挙げられるがそれらに限定されない。組換えタンパク質が細胞内でタンパク質を製造するためのその他の方法を利用して製造されており、本発明は、そのような組み換えタンパク質を製造する工場を生産するツールまたは技術として使用することができる。これらまたはその他のタンパク質をコードする核酸を本発明の核酸フラグメントの中に組み込み、そして細胞に導入することができる。細胞のDNAの核酸フラグメントの効率的な組み込みは本発明の組成物が存在するときに起きる。細胞が遺伝子導入動物の組織または器官の一部であるとき、大量の組換えタンパク質が得られ得る。

20 (細胞・生物学)

本明細書において使用される「細胞」は、当該分野において用いられる最も広義の意味と同様に定義され、多細胞生物の組織の構成単位であって、外界を隔離する膜構造に包まれ、内部に自己再生能を備え、遺伝情報およびその発現機構を有する生命体をいう。本明細書において使用される細胞は、本発明の核酸分子を導入することができる限り、どのような由来であっても使用することができ、天然に存在する細胞であっても、人工的に改変された細胞（例えば、

融合細胞、遺伝子改変細胞)であってもよい。細胞の供給源としては、例えば、単一の細胞培養物であり得、あるいは、正常に成長したトランスジェニック動物の胚、血液、または体組織、または正常に成長した細胞株由来の細胞のような細胞混合物が挙げられるがそれらに限定されない。好ましくは、形質転換またはトランスフェクションが容易な細胞が使用される。本発明において使用される細胞は、核酸分子を導入することが容易な細胞であることが好ましい。

本発明で用いられる細胞は、どの生物由来の細胞(たとえば、任意の種類の単細胞生物(例えば、細菌、酵母)または多細胞生物(例えば、動物(たとえば、脊椎動物、無脊椎動物)、植物(たとえば、単子葉植物、双子葉植物など)など))でもよい。例えば、脊椎動物(たとえば、メクラウナギ類、ヤツメウナギ類、軟骨魚類、硬骨魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳動物など)由来の細胞が用いられ、より詳細には、哺乳動物(例えば、単孔類、有袋類、貧齒類、皮翼類、翼手類、食肉類、食虫類、長鼻類、奇蹄類、偶蹄類、管歯類、有鱗類、海牛類、クジラ目、霊長類、齧歯類、ウサギ目など)由来の細胞が用いられる。

1つの実施形態では、霊長類(たとえば、チンパンジー、ニホンザル、ヒト)由来の細胞、特にヒト由来の細胞が用いられるがそれに限定されない。本発明において用いられる細胞は、上記細胞は、幹細胞であってもよく体細胞であってもよい。また、そのような細胞は、付着細胞、浮遊細胞、組織形成細胞およびそれらの混合物などであり得る。

本発明において、臓器が対象とされる場合、そのような臓器はどのような臓器でもよく、また本発明が対象とする組織または細胞は、生物のどの臓器または器官に由来するものでもよい。本明細書において「臓器」または「器官」とは、互換可能に用いられ、生物個体のある機能が個体内の特定の部分に局在して営まれ、かつその部分が形態的に独立性をもっている構造体をいう。一般に多細胞生物(例えば、動物、植物)では器官は特定の空間的配置をもついくつかの組織からなり、組織は多数の細胞からなる。そのような臓器または器官と

しては、血管系に関連する臓器または器官が挙げられる。1つの実施形態では、本発明が対象とする臓器は、皮膚、血管、角膜、腎臓、心臓、肝臓、臍帯、腸、神経、肺、胎盤、脾臓、脳、四肢末梢、網膜などが挙げられるがそれらに限定されない。植物の場合は、「器官」は、カルス、根、茎、幹、葉、花、種子、胚芽、胚、果実、胚乳などが挙げられるがそれらに限定されない。

本明細書において「組織」(tissue)とは、多細胞生物において、実質的に同一の機能および／または形態をもつ細胞集団をいう。通常「組織」は、同じ起源を有するが、異なる起源を持つ細胞集団であっても、同一の機能および／または形態を有するのであれば、組織と呼ばれ得る。従って、本発明の幹細胞を用いて組織を再生する場合、2以上の異なる起源を有する細胞集団が一つの組織を構成し得る。通常、組織は、臓器の一部を構成する。動物の組織は、形態的、機能的または発生的根拠に基づき、上皮組織、結合組織、筋肉組織、神経組織などに区別される。植物では、構成細胞の発達段階によって分裂組織と永久組織とに大別され、また構成細胞の種類によって単一組織と複合組織とに分けるなど、いろいろな分類が行われている。本発明では、組織を用いてセンサまたはチップを構成することもできる。

本明細書において「幹細胞」とは、自己複製能を有し、多分化能(すなわち多能性)(「pluripotency」)を有する細胞をいう。幹細胞は通常、組織が傷害を受けたときにその組織を再生することができる。本明細書では幹細胞は、胚性幹(ES)細胞または組織幹細胞(組織性幹細胞、組織特異的幹細胞または体性幹細胞ともいう)であり得るがそれらに限定されない。従って、本発明では、幹細胞の使用を直接使用することができる。

本明細書において「体細胞」とは、卵子、精子などの生殖細胞以外の細胞であり、そのDNAを次世代に直接引き渡さない全ての細胞をいう。体細胞は通常、多能性が限定されているかまたは消失している。本明細書において使用される体細胞は、天然に存在するものであってもよく、遺伝子改変されたもので

あってもよい。

本明細書において「単離された」とは、通常環境において天然に付随する物質が少なくとも低減されていること、好ましくは実質的に含まないをいう。

5 従って、単離された細胞とは、天然環境において付随する他の物質（たとえば、他の細胞、タンパク質、核酸など）を実質的に含まない細胞をいう。核酸またはポリペプチドについていう場合、「単離された」とは、たとえば、組換えDNA技術により作製された場合には細胞物質または培養培地を実質的に含まず、化学合成された場合には前駆体化学物質またはその他の化学物質を実質的に含まない、核酸またはポリペプチドを指す。単離された核酸は、好ましくは、
10 その核酸が由来する生物において天然に該核酸に隣接している（flanking）配列（即ち、該核酸の5'末端および3'末端に位置する配列）を含まない。

本明細書において、「樹立された」または「確立された」細胞とは、特定の性質（例えば、多分化能）を維持し、かつ、細胞が培養条件下で安定に増殖し続けるようになった状態をいう。したがって、樹立された幹細胞は、多分化能を維持する。本発明では、安定した結果を提供することができることから、この
15 ような樹立された細胞を用いることが好ましい。

本明細書において「分化（した）細胞」とは、機能および形態が特殊化した細胞（例えば、筋細胞、神経細胞など）をいい、幹細胞とは異なり、多能性はないか、またはほとんどない。分化した細胞としては、例えば、表皮細胞、脾
20 実質細胞、脾管細胞、肝細胞、血液細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞、骨格筋芽細胞、神経細胞、血管内皮細胞、色素細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞などが挙げられる。

本明細書において「生物体」は、生命体として存在し得る1個の個体として
25 存在し得る生物の一形態をいう。従って、植物の場合は、例えば、種子なども含まれ得る。

(生化学・分子生物学)

本明細書において、「遺伝子」とは、遺伝形質を規定する因子をいう。通常染色体上に一定の順序に配列している。タンパク質の一次構造を規定するものを構造遺伝子といい、その発現を左右するものを調節遺伝子（たとえば、プロモーター）という。本明細書では、遺伝子は、特に言及しない限り、構造遺伝子および調節遺伝子を包含する。したがって、例えば、トランスポザラーゼ遺伝子というときは、通常、トランスポザラーゼの構造遺伝子およびトランスポザラーゼのプロモーターの両方を包含するが、本発明の目的を達成することができる限り、トランスポザラーゼの構造遺伝子のみをさしてもよい。本明細書において通常、遺伝子とは、調節領域、コード領域、エキソン、イントロンを含む。本明細書では、「遺伝子」は、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」ならびに／または「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」を指すことがある。本明細書においてはまた、「遺伝子産物」は、遺伝子によって発現された「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸」ならびに／または「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」を包含する。当業者であれば、遺伝子産物が何たるかはその状況に応じて理解することができる。したがって、通常、本明細書において、遺伝子は、2本鎖DNAのみならず、それを構成するセンス鎖およびアンチセンス鎖といった各1本鎖DNAを包含し、またその長さは何ら制限されるものではない。従って、本発明の遺伝子には、特に言及しない限り、ヒトゲノムDNAを含む2本鎖DNA、およびcDNAを含む1本鎖DNA（センス鎖）、ならびにそのセンス鎖と相補的な配列を有する1本鎖DNA（アンチセンス鎖）、およびそれらのフラグメントのいずれもが含まれる。

本明細書において配列（例えば、核酸配列、アミノ酸配列など）の「相同性」とは、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。従って、ある2つの遺伝子の相同性が高いほど、それらの配列の同一性または類似性は高

い。2種類の遺伝子が相同性を有するか否かは、配列の直接の比較、または核酸の場合ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーション法によって調べられ得る。2つの遺伝子配列を直接比較する場合、その遺伝子配列間でDNA配列が、代表的には少なくとも50%同一である場合、好ましくは少なくとも70%同一である場合、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である場合、それらの遺伝子は相同性を有する。本明細書において、配列（例えば、核酸配列、アミノ酸配列など）の「類似性」とは、上記相同性において、保存的置換をポジティブ（同一）とみなした場合の、2以上の遺伝子配列の、互いに対する同一性の程度をいう。従って、保存的置換がある場合は、その保存的置換の存在に応じて同一性と類似性とは異なる。また、保存的置換がない場合は、同一性と類似性とは同じ数値を示す。

本明細書では、特に言及しない限り、アミノ酸配列および塩基配列の類似性、同一性および相同性の比較は、配列分析用ツールであるFASTAにおいてデフォルトパラメータを用いて算出される。

本明細書において使用される用語「タンパク質」、「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」および「ペプチド」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーをいう。このポリマーは、直鎖であっても分岐していてもよく、環状であってもよい。アミノ酸は、天然のものであっても非天然のものであってもよく、改変されたアミノ酸であってもよい。この用語はまた、複数のポリペプチド鎖の複合体へとアセンブルされたものを包含し得る。この用語はまた、天然または人工的に改変されたアミノ酸ポリマーも包含する。そのような改変としては、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化または任意の他の操作もしくは改変（例えば、標識成分との結合体化）を包含する。この定義にはまた、例えば、アミノ酸の1または2以上のアナログを含むポリペプチド（例えば、非天然のアミノ酸など

を含む)、ペプチド様化合物(例えば、ペプチド)および当該分野において公知の他の改変が包含される。タンパク質の遺伝子産物は、通常ポリペプチド形態をとるが、同様の機能を有する限り、ポリペプチドの改変体であってもよい。特定のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、そのフラグメント、同族体、誘導体、改変体を含む。

本明細書において使用される用語「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸分子」および「核酸」は、本明細書において同じ意味で使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマーをいう。この用語はまた、「誘導体オリゴヌクレオチド」または「誘導体ポリヌクレオチド」を含む。「誘導体オリゴヌクレオチド」または「誘導体ポリヌクレオチド」とは、ヌクレオチドの誘導体を含むか、またはヌクレオチド間の結合が通常とは異なるオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをいい、互換的に使用される。そのようなオリゴヌクレオチドとして具体的には、例えば、2'-O-メチルリボヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'-P5'ホスホロアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合とがペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、DNA中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキ

シリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチドなどが例示される。他にそうではないと示されなければ、特定の核酸配列はまた、明示的に示された配列と同様に、その保存的に改変された改変体（例えば、縮重コドン置換体）および相補配列を包含することが企図される。具体的には、縮重コドン置換体は、

5 1またはそれ以上の選択された（または、すべての）コドンの3番目の位置が混合塩基および／またはデオキシイノシン残基で置換された配列を作成することにより達成され得る（Batzera、Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsukaら、J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossoliniら、Mol. Cell

10 11. Probes 8:91-98 (1994))。タンパク質などの遺伝子は、通常、このポリヌクレオチド形態をとる。

本明細書において「ヌクレオチド」は、糖部分がリン酸エステルになっているヌクレオシドをいい、DNA、RNAなどを含み、天然のものでも非天然のものでもよい。ここで、ヌクレオシドは、塩基と糖とがN-グリコシド結合を

15 した化合物をいう。「誘導体ヌクレオチド」または「ヌクレオチドアナログ」とは、天然に存在するヌクレオチドとは異なるがもとのヌクレオチドと同様の機能を有するものをいう。そのような誘導体ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログは、当該分野において周知である。そのような誘導体ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログの例としては、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、メチルホスホネート、キラルメチルホスホネート、2-Ο-メチルリボ

20 ヌクレオチド、ペプチド-核酸（PNA）が含まれるが、これらに限定されない。DNAは、cDNA、ゲノムDNA、合成DNAを含む。な

1つの実施形態において、改変体は、天然に存在する対立遺伝子変異体、天然に存在しない変異体、欠失、置換、付加、および／または挿入がなされた変

25 異体；コードされるポリペプチドの機能を実質的に変更しないポリヌクレオチド配列を意味し得る。

1つの実施形態において、これらアミノ酸配列の改変（変異等）は、天然において、例えば変異、翻訳後の修飾等により生じることもあるが、天然由来の遺伝子（例えば本発明の具体例遺伝子）を利用して人為的にこれを行なうこともできる。

- 5 1つの実施形態において、上記ポリペプチドは、対立遺伝子変異体、ホモログ、天然の変異体で少なくとも70%、好ましくは80%、より好ましくは95%、さらにより好ましくは97%相同なものを含む。

本明細書において、「対応する」アミノ酸または核酸とは、それぞれあるポリペプチド分子またはポリヌクレオチド分子において、比較の基準となるポリペ
10 プチドまたはポリヌクレオチドにおける所定のアミノ酸と同様の作用を有するか、あるいは有することが予測されるアミノ酸または核酸をいい、特に酵素分子にあっては、活性部位中の同様の位置に存在し触媒活性に同様の寄与をするアミノ酸をいう。例えば、あるトランスポゾン配列であれば、そのトランスポ
ゾン配列の特定の部分に対応するオルソログにおける同様の部分であり得る。

- 15 本明細書において、「対応する」遺伝子（例えば、核酸分子、ポリペプチドなど）とは、ある種において、比較の基準となる種における所定の遺伝子と同様の作用を有するか、または有することが予測される遺伝子をいい、そのような作用を有する遺伝子が複数存在する場合、進化学的に同じ起源を有するものをいう。従って、ある遺伝子の対応する遺伝子は、その遺伝子のオルソログある
20 いは種相同体であり得る。したがって、マウストランスポゾン、マウストランスポザーゼなどに対応する遺伝子は、他の動物においても見出すことができる。そのような対応する遺伝子は、当該分野において周知の技術を用いて同定することができる。したがって、例えば、ある動物における対応する遺伝子は、対応する遺伝子の基準となる遺伝子（例えば、マウストランスポゾン、マウスト
25 ランスポザーゼなど）の配列をクエリ配列として用いてその動物（例えばヒト、ラット、イヌ、ネコ）の配列データベースを検索することによって見出すこと

ができる。このような対応する遺伝子は、ゲノムデータベースを利用すれば、当業者は容易に得ることができる。そのようなゲノム配列の入手方法は、当該分野において周知であり、本明細書において他の場所に記載される。本発明では、このような検索によって得られた配列も利用可能である。

- 5 本明細書において「フラグメント」とは、全長のポリペプチドまたはポリヌクレオチド（長さが n ）に対して、 $1 \sim n-1$ までの配列長さを有するポリペプチドまたはポリヌクレオチドをいう。フラグメントの長さは、その目的に応じて、適宜変更することができ、例えば、その長さの下限としては、ポリペプチドの場合、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、
10 40、50およびそれ以上のアミノ酸が挙げられ、ここの具体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、11など）もまた、下限として適切であり得る。また、ポリヌクレオチドの場合、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、75、100およびそれ以上のヌクレオチドが
15 挙げられ、ここの具体的に列挙していない整数で表される長さ（例えば、11など）もまた、下限として適切であり得る。本明細書において、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの長さは、上述のようにそれぞれアミノ酸または核酸の個数で表すことができるが、上述の個数は絶対的なものではなく、同じ機能（例えば、マウストランスポゾン、マウストランスポザーゼなどの機能）を有する限り、上限または加減としての上述の個数は、その個数の上下数個（または例えば上下10%）のものも含むことが意図される。そのような意図を表現するために、本明細書では、個数の前に「約」を付けて表現することがある。
20 しかし、本明細書では、「約」のあるなしはその数値の解釈に影響を与えないことが理解されるべきである。本発明では、マウストランスポゾン、マウストランスポザーゼなどとして機能する、すなわち、転位活性を有する限り、どのようなフラグメントであっても使用可能であることが理解される。
25

本明細書において使用される用語「生体分子」とは、生体に関連する分子を

いう。

本明細書において「生体」とは、生物学的な有機体をいい、動物、植物、菌類、ウイルスなどを含むがそれらに限定されない。従って、本明細書では生体分子は、生体から抽出される分子を包含するが、それに限定されず、生体に影響を与え得る分子であれば生体分子の定義に入る。したがって、コンビナトリアルケミストリで合成された分子、医薬品として利用され得る低分子（たとえば、低分子リガンドなど）もまた生体への効果が意図され得るかぎり、生体分子の定義に入る。そのような生体分子には、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、核酸（例えば、cDNA、ゲノムDNAのようなDNA、mRNAのようなRNAを含む）、ポリサッカライド、オリゴサッカライド、脂質、低分子（例えば、ホルモン、リガンド、情報伝達物質、有機低分子など）、これらの複合分子（糖脂質、糖タンパク質、リポタンパク質など）などが包含されるがそれらに限定されない。生体分子にはまた、細胞への導入が企図される限り、細胞自体、組織の一部も包含され得る。通常、生体分子は、核酸、タンパク質、脂質、糖、プロテオリピッド、リポプロテイン、糖タンパク質およびプロテオグリカンなどであり得る。好ましくは、生体分子は、核酸（DNAまたはRNA）またはタンパク質を含む。別の好ましい実施形態では、生体分子は、核酸（例えば、ゲノムDNAまたはcDNA、あるいはPCRなどによって合成されたDNA）である。他の好ましい実施形態では、生体分子はタンパク質であり得る。好ましくは、そのような生体分子は、ホルモンまたはサイトカインであり得る。

本明細書において「化学合成物」とは、通常の化学技術を用いて合成され得るすべての物質をいう。従って、化学合成物は、化学物質の範囲内にある。実質的には化学物質は、ほぼすべて合成することができる。そのような合成技術は、当該分野において周知であり、当業者は、適宜そのような技術を組み合わせて化学合成物を製造することができる。

本明細書において「生物学的活性」とは、ある因子（例えば、ポリペプチドまたはタンパク質）が、生体内において有し得る活性のことをいい、種々の機能（例えば、転位活性）を発揮する活性が包含される。ある因子がアンチセンス分子である場合、その生物学的活性は、対象となる核酸分子への結合、それ
5 による発現抑制などを包含する。例えば、ある因子が酵素である場合、その生物学的活性は、その酵素活性を包含する。別の例では、ある因子がリガンドまたはレセプターである場合、そのリガンドまたはレセプターがそれぞれ対応するレセプターまたはリガンドへの結合が生物学的活性に包含される。その生物学的活性が転写調節活性である場合は、転写レベルまたはその変動を調節する
10 活性をいう。例えば、ある因子がトランスポゾンであるとき、その生物学的活性は転位活性である。転位活性を測定する例は、例えば、実施例に記載されるような技術が挙げられ、そのような生物学的活性は、当該分野において周知の技術によって決定することができる。

本明細書において、「ストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、当該分野で慣用される周知の条件をいう。本発明のポリヌクレオチド中から選択されたポリヌクレオチドをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンプロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより、そのようなポリヌクレオチドを得ることができる。具体的には、コロニーあるいはプラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC (saline-sodium citrate) 溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM 塩化ナトリウム、15mM クエン酸ナトリウムである）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できる
20 ポリヌクレオチドを意味する。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning 2nd ed., Current Protocols
25

in Molecular Biology, Supplement 1-3
8、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995) 等の実験書に記載
5 されている方法に準じて行うことができる。ここで、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列からは、好ましくは、A配列のみまたはT配列のみを含む配列が除外される。「ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド」とは、上記ハイブリダイズ条件下で別のポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドをいう。ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドとして具体的には、本発明で具体的に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAの塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するポリヌクレオチド、好ましくは80%以上の相同性を有するポリヌクレオチド、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。

15 本明細書において「プローブ」とは、インビトロおよび／またはインビボなどのスクリーニングなどの生物学的実験において用いられる、検索の対象となる物質をいい、例えば、特定の塩基配列を含む核酸分子または特定のアミノ酸配列を含むペプチドなどが挙げられるがそれに限定されない。

通常プローブとして用いられる核酸分子としては、目的とする遺伝子の核酸
20 配列と相同なまたは相補的な、少なくとも8の連続するヌクレオチド長の核酸配列を有するものが挙げられる。そのような核酸配列は、好ましくは、少なくとも9の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは10の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは11の連続するヌクレオチド長の、12の連続するヌクレオチド長の、13の連続するヌクレオチド長の、14の連続するヌクレ
25 オチド長の、15の連続するヌクレオチド長の、20の連続するヌクレオチド長の、25の連続するヌクレオチド長の、30の連続するヌクレオチド長の、

40の連続するヌクレオチド長の、50の連続するヌクレオチド長の、核酸配列であり得る。プローブとして使用される核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも70%相同な、より好ましくは、少なくとも80%相同な、さらに好ましくは、90%相同な、95%相同な核酸配列が含まれる。

- 5 本明細書において、「検索」とは、電子的にまたは生物学的あるいは他の方法により、ある核酸塩基配列を利用して、特定の機能および／または性質を有する他の核酸塩基配列を見出すことをいう。電子的な検索としては、BLAST (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)), FASTA (Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85:2444-2448 (1988)), Smith and Waterman法 (Smith and Waterman, J. Mol. Biol. 147:195-197 (1981)), および Needleman and Wunsch法 (Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970)) などが挙げられるがそれらに限定されない。生物学的な検索としては、ストリンジェントハイブリダイゼーション、ゲノムDNAをナイロンメンブレン等に貼り付けたマクロアレイまたはガラス板に貼り付けたマイクロアレイ (マイクロアレイアッセイ)、PCRおよび in situハイブリダイゼーションなどが挙げられるがそれらに限定されない。本発明では、このような検索によって同定されたトランスポゾン、トランスポザーゼ、トランスポゾン配列などもまた、使用され得る。
- 10
15
20

本明細書において「高度にストリンジェントな条件」は、核酸配列において高度の相補性を有するDNA鎖のハイブリダイゼーションを可能にし、そしてミスマッチを有意に有するDNAのハイブリダイゼーションを除外するように設計された条件をいう。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、主に、温度、イオン強度、およびホルムアミドのような変性剤の条件によって決

25

定される。このようなハイブリダイゼーションおよび洗浄に関する「高度にストリンジェントな条件」の例は、0.0015M 塩化ナトリウム、0.0015M クエン酸ナトリウム、65~68℃、または0.015M 塩化ナトリウム、0.0015M クエン酸ナトリウム、および50% ホルムアミド、42℃である。このような高度にストリンジェントな条件については、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor, N, Y. 1989); およびAnderson et al., Nucleic Acid Hybridization: a Practical approach, IV, IRL Press Limited (Oxford, England), Limited, Oxford, Englandを参照のこと。必要により、よりストリンジェントな条件（例えば、より高い温度、より低いイオン強度、より高いホルムアミド、または他の変性剤）を、使用してもよい。

15 他の薬剤が、非特異的なハイブリダイゼーションおよび／またはバックグラウンドのハイブリダイゼーションを減少する目的で、ハイブリダイゼーション緩衝液および洗浄緩衝液に含まれ得る。そのような他の薬剤の例としては、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%ピロリン酸ナトリウム、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム (NaDodSO_4 またはSDS)、Ficoll、Denhardt溶液、超音波処理されたサケ精子DNA（または別の非相補的DNA）および硫酸デキストランであるが、他の適切な薬剤もまた、使用され得る。これらの添加物の濃度および型は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響を与えることなく変更され得る。ハイブリダイゼーション実験は、通常、pH6.8~7.4で実施されるが；代表的なイオン強度条件において、ハイブリダイゼーションの速度は、

25 ほとんどpH独立である。Anderson et al., Nucleic

Acid Hybridization: a Practical Approach、第4章、IRL Press Limited (Oxford, England) を参照のこと。

5 DNA二重鎖の安定性に影響を与える因子としては、塩基の組成、長さおよび塩基対不一致の程度が挙げられる。ハイブリダイゼーション条件は、当業者によって調整され得、これらの変数を適用させ、そして異なる配列関連性のDNAがハイブリッドを形成するのを可能にする。完全に一致したDNA二重鎖の融解温度は、以下の式によって概算され得る。

10
$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 16.6 (\log [\text{Na}^+]) + 0.41 (\%G+C) - 600/N - 0.72 (\% \text{ホルムアミド})$$

ここで、Nは、形成される二重鎖の長さであり、 $[\text{Na}^+]$ は、ハイブリダイゼーション溶液または洗浄溶液中のナトリウムイオンのモル濃度であり、%G+Cは、ハイブリッド中の（グアニン+シトシン）塩基のパーセンテージである。不完全に一致したハイブリッドに関して、融解温度は、各1%不一致（ミスマッチ）に対して約1℃ずつ減少する。

15

本明細書において「中程度にストリンジেন্টな条件」とは、「高度にストリンジेंटな条件」下で生じ得るよりも高い程度の塩基対不一致を有するDNA二重鎖が、形成し得る条件をいう。代表的な「中程度にストリンジेंटな条件」の例は、0.015M 塩化ナトリウム、0.0015M クエン酸ナトリウム、50～65℃、または0.015M 塩化ナトリウム、0.0015M クエン酸ナトリウム、および20%ホルムアミド、37～50℃である。

20

例として、0.015M ナトリウムイオン中、50℃の「中程度にストリンジेंटな」条件は、約21%の不一致を許容する。

本明細書において「高度」にストリンジेंटな条件と「中程度」にストリンジेंटな条件との間に完全な区別は存在しないことがあり得ることが、当業者によって理解される。例えば、0.015M ナトリウムイオン（ホルム

25

アミドなし)において、完全に一致した長いDNAの融解温度は、約71℃である。65℃(同じイオン強度)での洗浄において、これは、約6%不一致を許容にする。より離れた関連する配列を捕獲するために、当業者は、単に温度を低下させ得るか、またはイオン強度を上昇し得る。

- 5 約20ヌクレオチドまでのオリゴヌクレオチドプローブについて、1M NaClにおける融解温度の適切な概算は、

$$T_m = (1 \text{つのA-T塩基につき } 2^\circ\text{C}) + (1 \text{つのG-C塩基対につき } 4^\circ\text{C})$$

- によって提供される。なお、6×クエン酸ナトリウム塩(SSC)におけるナトリウムイオン濃度は、1Mである(Suggsら、Developmental Biology Using Purified Genes、683
10 頁、BrownおよびFox(編)(1981)を参照のこと)。

- トランスポゾン、トランスポザーゼまたはその改変体もしくはフラグメントなどのタンパク質をコードする天然の核酸は、例えば、配列番号1、2、10、12、14、16、18などの核酸配列の一部またはその改変体を含むPCR
15 プライマーおよびハイブリダイゼーションプローブを有するcDNAライブラリーから容易に分離される。好ましいトランスポザーゼまたはその改変体もしくはフラグメントなどをコードする核酸は、本質的に1%ウシ血清アルブミン(BSA); 500mM リン酸ナトリウム(NaPO_4); 1mM EDTA;
42℃の温度で 7% SDSを含むハイブリダイゼーション緩衝液、および
20 本質的に2×SSC(600mM NaCl; 60mM クエン酸ナトリウム); 50℃の0.1% SDSを含む洗浄緩衝液によって定義される低ストリンジェント条件下、さらに好ましくは本質的に50℃の温度での1%ウシ血清アルブミン(BSA); 500mM リン酸ナトリウム(NaPO_4); 15%ホルムアミド; 1mM EDTA; 7% SDS を含むハイブリダイゼーション緩衝液、および本質的に50℃の1×SSC(300mM NaCl; 3
25 0mM クエン酸ナトリウム); 1% SDSを含む洗浄緩衝液によって定義さ

れる低ストリンジェント条件下、最も好ましくは本質的に50℃の温度での
1%ウシ血清アルブミン (BSA); 200mM リン酸ナトリウム (NaPO_4); 15%ホルムアミド; 1mM EDTA; 7%SDSを含むハイブリダイ
ゼーション緩衝液、および本質的に65℃の0.5×SSC (150mM N
5 aCl; 15mM クエン酸ナトリウム); 0.1% SDSを含む洗浄緩衝液
によって定義される低ストリンジェント条件下に配列番号1、2、10、12、
14、16、18などに示される核酸配列の1つまたはその一部とハイブリダ
イズし得る。

本明細書において「プローブ」とは、インビトロおよび/またはインビボな
10 どのスクリーニングなどの生物学的実験において用いられる、検索の対象とな
る物質をいい、例えば、特定の塩基配列を含む核酸分子または特定のアミノ酸
配列を含むペプチドなどが挙げられるがそれに限定されない。

通常プローブとして用いられる核酸分子としては、目的とする遺伝子の核酸
配列と相同なまたは相補的な、少なくとも8の連続するヌクレオチド長の核酸
15 配列を有するものが挙げられる。そのような核酸配列は、好ましくは、少なく
とも9の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは少なくとも10の連続す
るヌクレオチド長の、さらに好ましくは少なくとも11の連続するヌクレオチ
ド長の、少なくとも12の連続するヌクレオチド長の、少なくとも13の連続
するヌクレオチド長の、少なくとも14の連続するヌクレオチド長の、少なく
20 とも15の連続するヌクレオチド長の、少なくとも20の連続するヌクレオチ
ド長の、少なくとも25の連続するヌクレオチド長の、少なくとも30の連続
するヌクレオチド長の、少なくとも40の連続するヌクレオチド長の、少なく
とも50の連続するヌクレオチド長の、少なくとも核酸配列であり得る。プロ
ープとして使用される核酸配列には、上述の配列に対して、少なくとも70%
25 相同な、より好ましくは、少なくとも80%相同な、さらに好ましくは、少な
くとも90%相同な、少なくとも95%相同な核酸配列が含まれる。このよう

なプローブを用いて本発明において使用され得るトランスポゾンを得ることができる。

本明細書における「プライマー」とは、高分子合成酵素反応において、合成される高分子化合物の反応の開始に必要な物質をいう。核酸分子の合成反応で
5 は、合成されるべき高分子化合物の一部の配列に相補的な核酸分子（例えば、DNAまたはRNAなど）が用いられ得る。

遺伝子工学分野において通常プライマーとして用いられる核酸分子としては、目的とする遺伝子の核酸配列と相補的な、少なくとも8の連続するヌクレオチド長の核酸配列を有するものが挙げられる。そのような核酸配列は、好ましくは、
10 は、少なくとも9の連続するヌクレオチド長の、より好ましくは10の連続するヌクレオチド長の、さらに好ましくは11の連続するヌクレオチド長の、12の連続するヌクレオチド長の、13の連続するヌクレオチド長の、14の連続するヌクレオチド長の、15の連続するヌクレオチド長の、16の連続するヌクレオチド長の、17の連続するヌクレオチド長の、18の連続するヌクレオチド長の、19の連続するヌクレオチド長の、20の連続するヌクレオチド長の、25の連続するヌクレオチド長の、30の連続するヌクレオチド長の、40の連続するヌクレオチド長の、50の連続するヌクレオチド長の、核酸配列であり得る。プローブとして使用される核酸配列には、上述の配列に対して、
15 少なくとも70%相同な、より好ましくは、少なくとも80%相同な、さらに好ましくは、90%相同な、95%相同な核酸配列が含まれる。プライマーとして適切な配列は、合成（増幅）が意図される配列の性質によって変動し得るが、当業者は、意図される配列に応じて適宜プライマーを設計することができる。そのようなプライマーの設計は当該分野において周知であり、手動でおこなってもよくコンピュータプログラム（例えば、LASERGENE, Primer Select, DNASTar）を用いて行ってもよい。このような
25 プライマーを用いて本発明に用いるトランスポゾンを作製することができる。

本明細書において、「エピトープ」とは、抗原決定基を意味する。従って、エピトープには特定の免疫グロブリンによる認識に関与するアミノ酸残基のセット、または、T細胞の場合は、T細胞レセプタータンパク質および／もしくは主要組織適合性複合体（MHC）レセプターによる認識について必要であるアミノ酸残基のセットが包含される。この用語はまた、「抗原決定基」または「抗原決定部位」と交換可能に使用される。免疫系分野において、インビボまたはインビトロで、エピトープは、分子の特徴（例えば、一次ペプチド構造、二次ペプチド構造または三次ペプチド構造および電荷）であり、免疫グロブリン、T細胞レセプターまたはHLA分子によって認識される部位を形成する。ペプチドを含むエピトープは、エピトープに独特な空間的コンフォメーション中に3つ以上のアミノ酸を含み得る。一般に、エピトープは、少なくとも5つのこのようなアミノ酸からなり、代表的には少なくとも6つ、7つ、8つ、9つ、または10のこのようなアミノ酸からなる。エピトープの長さは、より長いほど、もとのペプチドの抗原性に類似することから一般的に好ましいが、コンフォメーションを考慮すると、必ずしもそうでないことがある。アミノ酸の空間的コンフォメーションを決定する方法は、当該分野で公知であり、例えば、X線結晶学、および2次元核磁気共鳴分光法を含む。さらに、所定のタンパク質におけるエピトープの同定は、当該分野で周知の技術を使用して容易に達成される。例えば、Geysenら、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 81:3998 (1984) (所定の抗原における免疫原性エピトープの位置を決定するために迅速にペプチドを合成する一般的な方法)；米国特許第4,708,871号（抗原のエピトープを同定し、そして化学的に合成するための手順）；およびGeysenらMolecular Immunology 23:709 (1986) (所定の抗体に対して高い親和性を有するペプチドを同定するための技術)を参照されたい。同じエピトープを認識する抗体は、単純な免疫アッセイにおいて同定され得る。このように、ペプチドを含むエピト

ープを決定する方法は、当該分野において周知であり、そのようなエピトープは、核酸またはアミノ酸の一次配列が提供されると、当業者はそのような周知慣用技術を用いて決定することができる。

5 従って、ペプチドを含むエピトープとして使用するためには、少なくとも3アミノ酸の長さの配列が必要であり、好ましくは、この配列は、少なくとも4アミノ酸、より好ましくは5アミノ酸、6アミノ酸、7アミノ酸、8アミノ酸、9アミノ酸、10アミノ酸、15アミノ酸、20アミノ酸、25アミノ酸の長さの配列が必要であり得る。エピトープは、市販のキット（例えば、Pe p S e tTM（クラボウ））を用いて当業者が容易に決定することができる。本発明で
10 は、あるシグナル伝達において役割を果たすタンパク質のエピトープを提示することによって、シグナル伝達を測定する系を利用してもよい。

本明細書においてある核酸分子またはポリペプチドに「特異的に結合する因子」とは、その核酸分子またはポリペプチドに対するその因子の結合レベルが、その核酸分子またはポリペプチド以外の核酸分子またはポリペプチドに対する
15 その因子の結合レベルと同じかまたはそれよりも高い因子をいう。そのような因子としては、例えば、対象が核酸分子の場合、対象となる核酸分子に対して相補的な配列を有する核酸分子、対象となる核酸配列に対して結合するポリペプチド（例えば、転写因子など）などが挙げられ、対象がポリペプチドの場合、抗体、単鎖抗体、レセプターーリガンドの対のいずれか一方、酵素－基質のい
20 ずれか一方などが挙げられるがそれらに限定されない。本明細書において、このような特異的に結合する因子（例えば、カルシウムに特異的に結合する因子、特定の遺伝子産物に対する抗体など）は、シグナル伝達を測定する際に利用され得る。

（ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの改変）

25 本発明では、トランスポゾン、トランスポザーゼなどの機能的ポリペプチドを使用する場合、同様の機能（転位活性など）が達成することができる限り、

その改変体を使用してもよい。

ここで、あるタンパク質分子において、配列に含まれるあるアミノ酸は、相互作用結合能力の明らかな低下または消失なしに、例えば、カチオン性領域または基質分子の結合部位のようなタンパク質構造において他のアミノ酸に置換
5 され得る。あるタンパク質の生物学的機能を規定するのは、タンパク質の相互作用能力および性質である。従って、特定のアミノ酸の置換がアミノ酸配列において、またはそのDNAコード配列のレベルにおいて行われ得、置換後もなお、もとの性質を維持するタンパク質が生じ得る。従って、生物学的有用性の明らかな損失なしに、種々の改変が、本明細書において開示されたペプチドまたはこのペプチドをコードする対応するDNAにおいて行われ得る。
10

上記のような改変を設計する際に、アミノ酸の疎水性指数が考慮され得る。タンパク質における相互作用的な生物学的機能を与える際の疎水性アミノ酸指数の重要性は、一般に当該分野で認められている (K y t e, J および D o o l l i t t l e, R. F. J. M o l. B i o l. 1 5 7 (1): 1 0 5-1 3 2, 1 9 8 2)。アミノ酸の疎水的性質は、生成したタンパク質の二次構造に寄与し、
15 次いでそのタンパク質と他の分子 (例えば、酵素、基質、レセプター、DNA、抗体、抗原など) との相互作用を規定する。各アミノ酸は、それらの疎水性および電荷の性質に基づく疎水性指数を割り当てられる。それらは: イソロイシン (+4. 5); バリン (+4. 2); ロイシン (+3. 8); フェニルアラニン (+2. 8); システイン/シスチン (+2. 5); メチオニン (+1. 9); ア
20 ラニン (+1. 8); グリシン (-0. 4); スレオニン (-0. 7); セリン (-0. 8); トリプトファン (-0. 9); チロシン (-1. 3); プロリン (-1. 6); ヒスチジン (-3. 2); グルタミン酸 (-3. 5); グルタミン (-3. 5); アスパラギン酸 (-3. 5); アスパラギン (-3. 5); リジン (-3. 9); およびアルギニン (-4. 5)) である。
25

あるアミノ酸を、同様の疎水性指数を有する他のアミノ酸により置換して、

そして依然として同様の生物学的機能を有するタンパク質（例えば、酵素活性において等価なタンパク質）を生じさせ得ることが当該分野で周知である。このようなアミノ酸置換において、疎水性指数が±2以内であることが好ましく、±1以内であることがより好ましく、および±0.5以内であることがさらに好ましい。疎水性に基づくこのようなアミノ酸の置換は効率的であることが当該分野において理解される。米国特許第4,554,101号に記載されるように、以下の親水性指数がアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン（+3.0）；リジン（+3.0）；アスパラギン酸（+3.0±1）；グルタミン酸（+3.0±1）；セリン（+0.3）；アスパラギン（+0.2）；グルタミン（+0.2）；グリシン（0）；スレオニン（-0.4）；プロリン（-0.5±1）；アラニン（-0.5）；ヒスチジン（-0.5）；システイン（-1.0）；メチオニン（-1.3）；バリン（-1.5）；ロイシン（-1.8）；イソロイシン（-1.8）；チロシン（-2.3）；フェニルアラニン（-2.5）；およびトリプトファン（-3.4）。アミノ酸が同様の親水性指数を有しかつ依然として生物学的等価体を与え得る別のものに置換され得ることが理解される。このようなアミノ酸置換において、親水性指数が±2以内であることが好ましく、±1以内であることがより好ましく、および±0.5以内であることがさらに好ましい。

例えば、下記のRNAコドン（それ故、対応のDNAコドンではTがUに置き代わる）が各特定のアミノ酸をコードするのに交換可能に利用できることが当業界において周知である：フェニルアラニン（PheまたはF）UUUまたはUUCロイシン（LeuまたはL）UUA, UUG, CUU, CUC, CUAまたはCUGイソロイシン（IleまたはI）AUU, AUCまたはAUAメチオニン（MetまたはM）AUGバリン（ValまたはV）GUU, GUC, GUA, GUGセリン（SerまたはS）UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGCプロリン（ProまたはP）CCU, CCC, CCA, C

CGスレオニン (Th rまたはT) ACU, ACC, ACA, ACGアラニン
(Al aまたはA) GCU, GCG, GCA, GCCチロシン (Ty rまたは
Y) UAUまたはUACヒスチジン (Hi sまたはH) CAUまたはCACグ
ルタミン (Gl nまたはQ) CAAまたはCAGアスパラギン (As nまたは
5 N) AAUまたはAACリジン (Ly sまたはK) AAAまたはAAGアスパ
ラギン酸 (As pまたはD) GAUまたはGACグルタミン酸 (Gl uまたは
E) GAAまたはGAGシステイン (Cy sまたはC) UGUまたはUGCア
ルギニン (Ar gまたはR) CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AG
Cグリシン (Gl yまたはG) GGUまたはGGCまたはGGAまたはGGG
10 終止コドン UAA, UAGまたはUGA さらに、特定のDNA配列を修飾
して特定の細胞タイプは好適なコドンを採用することができる。例えば、E.
c o l i のための好適なコドン用法は、動物およびヒトにとっての好適なコド
ン用法と同じように公知である。このような変更は当業者に周知であり、本発
明の一部を構成する。

15 このようにして作製した改変体もまた、本発明の範囲内にあり、任意のその
ような改変体が発明において利用され得る。

(抗原・抗体)

本明細書において用いられる用語「抗体」は、ポリクローナル抗体、モノク
ローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、多重特異性抗体、キメラ抗体、および
20 抗イディオタイプ抗体、ならびにそれらの断片、例えばF (a b')₂およびF
a bフラグメント、ならびにその他の組換えにより生産された結合体を含む。
さらにこのような抗体を、酵素、例えばアルカリホスファターゼ、西洋ワサビ
ペルオキシダーゼ、αガラクトシダーゼなど、に共有結合させまたは組換えに
より融合させてよい。

25 本明細書中で使用される用語「モノクローナル抗体」は、同質な抗体集団を
有する抗体組成物をいう。この用語は、それが作製される様式によって限定さ

れない。この用語は、全免疫グロブリン分子ならびにF a b分子、F (a b')₂フラグメント、F vフラグメント、およびもとのモノクローナル抗体分子の免疫学的結合特性を示す他の分子を含む。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を作製する方法は当該分野で公知であり、そして以下でより十分に記載される。

モノクローナル抗体は、当該分野で周知の標準的な技術（例えば、K o h l e rおよびM i l s t e i n, N a t u r e 2 5 6 : 4 9 5 (1975)) またはその改変（例えば、B u c kらI n V i t r o 1 8 : 3 7 7 (1982)) を使用して調製される。代表的には、マウスまたはラットを、タンパク質キャリアに結合したタンパク質で免疫化し、追加免疫し、そして脾臓（および必要に応じていくつかの大きなリンパ節）を取り出し、そして単一細胞を解離する。必要に応じて、この脾臓細胞は、非特異的接着細胞の除去後、抗原でコーティングされたプレートまたはウェルに細胞懸濁液を適用することにより、スクリーニングされ得る。抗原に特異的なイムノグロブリンを発現するB細胞がプレートに結合し、そして懸濁液の残渣でもリンス除去されない。次いで、得られたB細胞（すなわちすべての剥離した脾臓細胞）をミエローマ細胞と融合させて、ハイブリドーマを得、このハイブリドーマを用いてモノクローナル抗体を産生させることができる。

本明細書において「抗原」(a n t i g e n) とは、抗体分子によって特異的に結合され得る任意の基質をいう。本明細書において「免疫原」(i m m u n o g e n) とは、抗原特異的免疫応答を生じるリンパ球活性化を開始し得る抗原をいう。したがって、トランスポザーゼまたはその下流の産物は、抗原または免疫原として使用され、抗原抗体反応を利用して本発明のセンサを実現することができる。

25 (遺伝子操作)

本明細書において、「遺伝子カセット」とは、遺伝子をコードするDNAと、

これに作動可能に（すなわち、そのDNAの発現を制御し得るように）連結された植物遺伝子プロモーターとを含む核酸配列、ならびに、必要に応じてプロモーターと、これに作動可能に（すなわち、インフレームに）連結された異種遺伝子とを含む核酸配列をいう。このカセットは、必要に応じて他の調節エレメントと組み合わせて使用することもまた、本発明の範囲に含まれる。好ましい発現カセットは、特定の制限酵素で切断され、容易に回収され得る遺伝子カセットである。

本明細書において遺伝子操作について言及する場合、「ベクター」または「組み換えベクター」とは、目的のポリヌクレオチド配列を目的の細胞へと移入させることができるベクターをいう。そのようなベクターとしては、原核細胞、酵母、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、動物個体および植物個体などの宿主細胞において自立複製が可能、または染色体中への組込みが可能で、本発明のポリヌクレオチドの転写に適した位置にプロモーターを含有しているものが例示される。ベクターのうち、クローニングに適したベクターを「クローニングベクター」という。そのようなクローニングベクターは通常、制限酵素部位を複数含むマルチプルクローニング部位を含む。そのような制限酵素部位およびマルチプルクローニング部位は、当該分野において周知であり、当業者は、目的に合わせて適宜選択して使用することができる。そのような技術は、本明細書に記載される文献（例えば、S a m b r o o kら、前出）に記載されている。

本明細書において「発現ベクター」とは、構造遺伝子およびその発現を調節するプロモーターに加えて種々の調節エレメントが宿主の細胞中で作動し得る状態で連結されている核酸配列をいう。調節エレメントは、好ましくは、ターミネーター、薬剤耐性遺伝子のような選択マーカーおよび、エンハンサーを含み得る。生物（例えば、動物）の発現ベクターのタイプおよび使用される調節エレメントの種類が、宿主細胞に応じて変わり得ることは、当業者に周知の事項である。

原核細胞に対する組換えベクターとしては、p cDNA3 (+)、pBlue script-SK (+/-)、pGEM-T、pEF-BOS、pEGFP、pHAT、pUC18、pFT-DEST™42GATEWAY (Invitrogen) などが例示される。

- 5 動物細胞に対する組換えベクターとしては、p cDNAI/Amp、p cDNAI、pCDM8 (いずれもフナコシより市販)、pAGE107 [特開平3-229 (Invitrogen)、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pAMo、pAMoA [J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)]、マウス幹細胞ウイルス (Murine Stem Cell Virus) (MSCV) に基づいたレトロウイルス型発現ベクター、pEF-BOS、pEGFPなどが例示される。

植物細胞に対する組換えベクターとしては、pPCVICEn4HPT、pCGN1548、pCGN1549、pBI221、pBI121などが挙げられるがそれらに限定されない。

- 15 本明細書において「ターミネーター」とは、通常遺伝子のタンパク質をコードする領域の下流に位置し、DNAがmRNAに転写される際の転写の終結、ポリA配列の付加に関与する配列をいう。ターミネーターは、mRNAの安定性に関与して遺伝子の発現量に影響を及ぼすことが知られている。

- 本明細書において「プロモーター」とは、遺伝子の転写の開始部位を決定し、
20 またその頻度を直接的に調節するDNA上の領域をいい、通常RNAポリメラーゼが結合して転写を始める塩基配列である。したがって、本明細書においてある遺伝子のプロモーターの働きを有する部分を「プロモーター部分」という。プロモーターの領域は、通常、推定タンパク質コード領域の第1エキソンの上流約2kbp以内の領域であることが多いので、DNA解析用ソフトウェアを用いてゲノム塩基配列中のタンパク質コード領域を予測すれば、プロモータ領域を推定することはできる。推定プロモーター領域は、構造遺伝子ごとに変動
- 25

するが、通常構造遺伝子上流にあるが、これらに限定されず、構造遺伝子の下流にもあり得る。好ましくは、推定プロモーター領域は、第一エキソン翻訳開始点から上流約2 k b p以内に存在する。

5 本明細書において「エンハンサー」とは、目的遺伝子の発現効率を高めるために用いられる配列をいう。そのようなエンハンサーは当該分野において周知である。エンハンサーは複数個用いられ得るが1個用いられてもよいし、用いなくともよい。

10 本明細書において「サイレンサー」とは、遺伝子発現を抑制し静止する機能を有する配列をいう。本発明では、サイレンサーとしてはその機能を有する限り、どのようなものを用いてもよく、サイレンサーを用いなくともよい。

15 本明細書において「作動可能に連結された(る)」とは、所望の配列の発現(作動)がある転写翻訳調節配列(例えば、プロモーター、エンハンサー、サイレンサーなど)または翻訳調節配列の制御下に配置されることをいう。プロモーターが遺伝子に作動可能に連結されるためには、通常、その遺伝子のすぐ上流にプロモーターが配置されるが、必ずしも隣接して配置される必要はない。

本明細書において、核酸分子を細胞に導入する技術は、どのような技術でもよく、例えば、形質転換、形質導入、トランスフェクションなどが挙げられる。そのような核酸分子の導入技術は、当該分野において周知であり、かつ、慣用されるものであり、例えば、Ausubel F. A. ら編(1988)、Current Protocols in Molecular Biology、Wiley、New York、NY; Sambrook J ら(1987) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. およびその第三版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載される。遺伝子の導入は、ノーザンブロット、ウェスタンブ

20
25

ロット分析のような本明細書に記載される方法または他の周知慣用技術を用いて確認することができる。

また、ベクターの導入方法としては、細胞にDNAを導入する上述のような方法であればいずれも用いることができ、例えば、トランスフェクション、形質導入、形質転換など（例えば、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法など）、リポフェクション法、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983)]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978) 記載の方法が挙げられる。

本明細書において「遺伝子導入試薬」とは、核酸（通常遺伝子をコードするが、それに限定されない）の導入方法において、導入効率を促進するために用いられる試薬をいう。そのような遺伝子導入試薬としては、例えば、カチオン性高分子、カチオン性脂質、ポリアミン系試薬、ポリイミン系試薬、リン酸カルシウムなどが挙げられるがそれらに限定されない。トランスフェクションの際に利用される試薬の具体例としては、種々なソースから市販されている試薬が挙げられ、例えば、Effectene Transfection Reagent (cat. no. 301425, Qiagen, CA), TransFast™ Transfection Reagent (E2431, Promega, WI), Tfx™-20 Reagent (E2391, Promega, WI), SuperFect Transfection Reagent (301305, Qiagen, CA), PolyFect Transfection Reagent (301105, Qiagen, CA), LipofectAMINE 2000 Reagent (11668-019, Invitrogen corporation, CA), JetPEI (×4)

conc. (101-30, Polyplus-transfection, France) および ExGen 500 (R0511, Fermentas Inc., MD) などが挙げられるがそれらに限定されない。本発明においては、本発明の核酸分子を細胞に導入する際にこのような遺伝子導入試薬が使用され

5 得る。

遺伝子導入効率は、単位面積（例えば、 1mm^2 など）あたりの導入外来物質（導入遺伝子）（例えば、レポーター遺伝子の産物、蛍光タンパク質 GFP など）の導入（発現）細胞数、または総信号（蛍光タンパク質の場合は、蛍光）量を測定することによって算定することができる。

10 本明細書において「形質転換体」とは、形質転換によって作製された細胞などの生命体の全部または一部（組織など）をいう。形質転換体としては、原核生物、酵母、動物、植物、昆虫などの細胞などの生命体の全部または一部（組織など）が例示される。形質転換体は、その対象に依存して、形質転換細胞、形質転換組織、形質転換宿主などともいわれる。本発明において用いられる細胞は、形質転換体であってもよい。

本発明において遺伝子操作などにおいて原核生物細胞が使用される場合、原核生物細胞としては、Escherichia 属、Serratia 属、Bacillus 属、Brevibacterium 属、Corynebacterium 属、Microbacterium 属、Pseudomonas 属などに属する原核生物細胞、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1 が例示される。あるいは、本発明では、天然物から分離した細胞も使用することができる。

25 本明細書において遺伝子操作などにおいて使用され得る動物細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞である CHO 細胞、BHK 細胞、アフ

- リカミドリザル腎臓細胞、ヒト白血病細胞、HBT5637（特開昭63-299）、ヒト結腸癌細胞株などを挙げるができる。マウス・ミエローマ細胞としては、ps20、NSOなど、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0など、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293（ATCC：CRL-1573）など、ヒト白血病細胞としてはBALL-1など、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7、ヒト結腸癌細胞株としてはHCT-15、ヒト神経芽細胞腫SK-N-SH、SK-N-SH-5Y、マウス神経芽細胞腫Neuro2Aなどが例示される。あるいは、本発明では、初代培養細胞も使用することができる。
- 10 本明細書において遺伝子操作などにおいて使用され得る植物細胞としては、カルスまたはその一部および懸濁培養細胞、ナス科、イネ科、アブラナ科、バラ科、マメ科、ウリ科、シソ科、ユリ科、アカザ科、セリ科などの植物の細胞が挙げられるがそれらに限定されない。
- 本明細書において遺伝子発現（たとえば、mRNA発現、ポリペプチド発現）
- 15 の「検出」または「定量」は、例えば、mRNAの測定および免疫学的測定方法を含む適切な方法を用いて達成され得る。分子生物学的測定方法としては、例えば、ノーザンブロット法、ドットブロット法またはPCR法などが例示される。免疫学的測定方法としては、例えば、方法としては、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、RIA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット
- 20 法、免疫組織染色法などが例示される。また、定量方法としては、ELISA法またはRIA法などが例示される。アレイ（例えば、DNAアレイ、プロテインアレイ）を用いた遺伝子解析方法によっても行われ得る。DNAアレイについては、（秀潤社編、細胞工学別冊「DNAマイクロアレイと最新PCR法」）に広く概説されている。プロテインアレイについては、Nat Genet.
- 25 2002 Dec; 32 Suppl: 526-32に詳述されている。遺伝子発現の分析法としては、上述に加えて、RT-PCR、RACE法、SSC

P法、免疫沈降法、two-hybridシステム、インビトロ翻訳などが挙げられるがそれらに限定されない。そのようなさらなる分析方法は、例えば、ゲノム解析実験法・中村祐輔ラボ・マニュアル、編集・中村祐輔 羊土社（2002）などに記載されており、本明細書においてそれらの記載はすべて参考として援用される。

本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなど遺伝子産物の「発現」とは、その遺伝子などがインビボで一定の作用を受けて、別の形態になることをいう。好ましくは、遺伝子、ポリヌクレオチドなどが、転写および翻訳されて、ポリペプチドの形態になることをいうが、転写されてmRNAが作製されることもまた発現の一形態であり得る。より好ましくは、そのようなポリペプチドの形態は、翻訳後プロセッシングを受けたものであり得る。

「発現量」とは、目的の細胞などにおいて、ポリペプチドまたはmRNAが発現される量をいう。そのような発現量としては、本発明の抗体を用いてELISA法、RIA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法などの免疫学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明ポリペプチドのタンパク質レベルでの発現量、またはノーザンブロット法、ドットブロット法、PCR法などの分子生物学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明のポリペプチドのmRNAレベルでの発現量が挙げられる。

「発現量の変化」とは、上記免疫学的測定方法または分子生物学的測定方法を含む任意の適切な方法により評価される本発明のポリペプチドのタンパク質レベルまたはmRNAレベルでの発現量が増加あるいは減少することを意味する。

従って、本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなどの「発現」または「発現量」の「減少」とは、本発明の因子を作用させたときに、作用させないときよりも、発現の量が有意に減少することをいう。好ましくは、発現の減少は、ポリペプチドの発現量の減少を含む。本明細書において遺伝子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなどの「発現」または「発現量」の「増加」

とは、細胞内に遺伝子発現に関連する因子（例えば、発現されるべき遺伝子またはそれを調節する因子）を導入したときに、作用させないときよりも、発現の量が有意に増加することをいう。好ましくは、発現の増加は、ポリペプチドの発現量の増加を含む。本明細書において遺伝子の「発現」の「誘導」とは、

- 5 ある細胞にある因子を作用させてその遺伝子の発現量を増加させることをいう。したがって、発現の誘導は、まったくその遺伝子の発現が見られなかった場合にその遺伝子が発現するようにすること、およびすでにその遺伝子の発現が見られていた場合にその遺伝子の発現が増大することを包含する。

- 10 本明細書において、遺伝子が「特異的に発現する」とは、その遺伝子が、特定の部位または時期において他の部位または時期とは異なる（好ましくは高い）レベルで発現されることをいう。特異的に発現するとは、ある部位（特異的部位）にのみ発現してもよく、それ以外の部位においても発現していてもよい。好ましくは特異的に発現するとは、ある部位においてのみ発現することをいう。本発明によって生物に導入される遺伝子は、特異的に発現するように改変されて
- 15 いてもよい。

- 本明細書において「生物学的活性」とは、ある因子（例えば、ポリペプチドまたはタンパク質）が、生体内において有し得る活性のことをいい、種々の機能（例えば、転写促進活性）を発揮する活性が包含される。例えば、コラーゲンがそのリガンドと相互作用する場合、その生物学的活性は、結合体の形成または他の生物学的変化を包含する。別の好ましい実施形態では、そのような生物学的活性は、遺伝子転位活性などであり得る。遺伝子転位活性は、その目的とする遺伝子をコードする配列の移動を任意の方法によって確認することによって判定され得る。例えば、ある因子が酵素である場合、その生物学的活性は、その酵素活性を包含する。別の例では、ある因子がリガンドである場合、その
- 20 リガンドが対応するレセプターへの結合を包含する。そのような生物学的活性は、当該分野において周知の技術によって測定することができる (M o l e c
- 25

ular Cloning、Current Protocols (本明細書において引用)などを参照)。

5 本明細書において「キット」とは、通常2つ以上の区画に分けて、提供されるべき部分(例えば、試薬、粒子など)が提供されるユニットをいう。混合されて提供されるべきでなく、使用直前に混合して使用することが好ましいような組成物の提供を目的とするときに、このキットの形態は好ましい。そのようなキットは、好ましくは、提供される部分(例えば、試薬、粒子など)をどのように処理すべきかを記載する説明書を備えていることが有利である。このような説明書は、どのような媒体であつてもよく、例えば、そのような媒体としては、紙媒体、伝送媒体、記録媒体などが挙げられるがそれらに限定されない。
10 伝送媒体としては、例えば、インターネット、イントラネット、エクストラネット、LANなどが挙げられるがそれらに限定されない。記録媒体としては、CD-ROM、CD-R、フレキシブルディスク、DVD-ROM、MD、ミニディスク、MO、メモリースティックなどが挙げられるがそれらに限定されない。
15 ない。

(トランスジェニック生物)

トランスジェニックマウスを作製するための一般的な技術は、国際公開WO 01/13150 (Ludwig Inst. Cancer Res.)に記載されている。米国特許第4,873,191号 (Wagner et al.)
20 は、哺乳動物接合体へのDNAのマイクロインジェクションによって得られた、外因性DNAを有する哺乳動物を教示している。さらに転位性遺伝因子(トランスポゾン)を内因性DNAに挿入あるいはさらに転位させることで、該DNAの構造変化を起こしてこれを不活性化させ、動植物等の変異体を効率的に作出する方法が研究されてきている。トランスポゾンを利用した、染色体への特定遺伝子の導入・付加等が可能となつてきている。
25

このほかにもまた、トランスジェニック生物を作り出すための様々な方法は、

例えば、M. Markkulaら、Rev. Reprod., 1, 97-106 (1996); R. T. Wallら J. Dairy Sci., 80, 2213-2224 (1997); J. C. Daltonら、Adv. Exp. Med. Biol., 411, 419-428 (1997); および H. Lubonら、Transfus. Med. Rev., 10, 131-143 (1996) などが挙げられるがそれらに限定されない。これらの文献の各々は、本明細書において参考として援用される。

そのような中、最近10年間ほどで、遺伝子機能の解析を目的として、胚性幹 (ES) 細胞の相同組換えを介したトランスジェニック (ノックアウト、ノックインを含む) 動物の解析が重要な手段となってきた。

高等生物では、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子を用いる陽性選択および HSV のチミジンキナーゼ遺伝子またはジフテリア毒素遺伝子を用いる陰性選択により組換え体の効率的な選別が行われている。PCR またはサザンブロット法により相同組換え体の選択が行われる。すなわち、標的遺伝子の一部を陽性選択用のネオマイシン耐性遺伝子等で置換し、その末端に陰性選択用の HSV TK 遺伝子等を連結したターゲティングベクターを作成し、エレクトロポレーションにより ES 細胞に導入し、G418 およびガンシクロビルが存在下で選択して、生じたコロニーを単離し、さらに PCR またはサザンブロットにより相同組換え体を選択する。

このように、内在する標的遺伝子を置換または破壊して、機能が喪失したかまたは変更された変異を有するトランスジェニック (標的遺伝子組換え) マウスを作製する方法は、標的とした遺伝子だけに変異が導入されるので、その遺伝子機能の解析に有用である。

所望の相同組換え体を選択した後、得られた組換え ES 細胞を胚盤注入法または集合キメラ法により正常な胚と混合して ES 細胞と宿主胚とのキメラマウスを作製する。胚盤注入法では、ES 細胞を胚盤胞にガラスピペットで注入す

る。集合キメラ法では、ES細胞の塊と透明帯を除去した8細胞期の胚とを接
着させる。ES細胞を導入した胚盤胞を偽妊娠させた代理母の子宮に移植して
キメラマウスを得る。ES細胞は、全能性を有するので、生体内では、生殖細
胞を含め、あらゆる種類の細胞に分化することができる。ES細胞由来の生殖
5 細胞を有するキメラマウスと正常マウスを交配させるとES細胞の染色体をヘ
テロに有するマウスが得られ、このマウス同士を交配するとES細胞の改変染
色体をホモに有するトランスジェニックマウスが得られる。得られたキメラマ
ウスから改変染色体をホモに有するトランスジェニックマウスを得るには、雄
性キメラマウスと雌性野生型マウスとを交配して、F1世代のヘテロ接合体マ
ウスを産出させ、生まれた雄性および雌性のヘテロ接合体マウスを交配して、
10 F2世代のホモ接合体マウスを選択する。F1およびF2の各世代において所
望の遺伝子変異が導入されているか否かは、組換えES細胞のアッセイと同様
に、サザンブロッティング、PCR、塩基配列の解読など当該分野において慣
用される方法を用いて分析され得る。

15 しかし、現在行われているトランスジェニック動物の作製技術では、多様な
遺伝子機能を選択的に解析することが困難であるという欠点を有する。また容
易にトランスジェニック生物を作製できないという欠点も存在する。

また、現行のトランスジェニック動物の作製は、目的の遺伝子を同定した後
に、上述のようにその目的の遺伝子を一から置換または破壊および置換するこ
20 とが必要であり、非常に労力および時間がかかる上、熟練した研究者でも必ず
うまくいくとは限らない。従って、未だに労働集約的な作業を要する仕事であ
る。

そのため、多様な遺伝子機能を選択的に解析することができないという問題
を克服する次世代技術として、Creレコンビナーゼの細胞種特異的発現とC
25 re-loxPの部位特異的組み換えを併用する技術が注目されている。Cre
e-loxPを用いるトランスジェニックマウスは、標的遺伝子の発現を阻害

しない位置にネオマイシン耐性遺伝子を導入し、後に削除するエクソンをはさむようにして $loxP$ 配列を挿入したターゲティングベクターをES細胞に導入し、その後相同組換え体を単離する。この単離したクローンからキメラマウスを得、遺伝子改変マウスが作製される。次に、大腸菌のP1ファージ由来の部位特異的組換え酵素Creを組織特異的に発現するトランスジェニックマウスとこのマウスを交配させると、Creを発現する組織中でのみ遺伝子が破壊される（ここでは、Creは、 $loxP$ 配列（34bp）を特異的に認識して、2つの $loxP$ 配列にはさまれた配列で組換えを起こさせ、これが破壊される）。臓器特異的なプロモータに連結したCre遺伝子を有するトランスジェニックマウスと交配させるか、またはCre遺伝子を有するウイルスベクターを使用して、成体でCreを発現させることができる。

特定の遺伝子を解析する方法としてジーントラップ（遺伝子トラップ）法が注目されている。ジーントラップ法では、プロモータを有しないレポーター遺伝子が細胞に導入され、その遺伝子が偶発的にゲノム上に挿入されると、レポーター遺伝子が発現することを利用して、新規な遺伝子を単離（トラップ）される。ジーントラップ法は、マウス初期胚操作法、胚性幹細胞培養法、相同組換えによる遺伝子ターゲティング法に基づく、効率的な挿入変異と未知遺伝子同定のための方法である（Stanford WL., et al., Nature Genetics 2:756-768 (2001)）。ジーントラップ法では、遺伝子の導入ならびに挿入変異体の選択およびその表現型解析が比較的容易である。

ジーントラップ法では、例えば、スプライシング/アクセプター配列とポリA付加シグナルとの間にlacZとneoとの融合遺伝子である β -geoを連結したジーントラップベクターをES細胞に導入し、G418で選択すると、ES細胞で発現している遺伝子を偶然にトラップしたクローンだけが選択される。

このようにして得られたクローンからキメラ胚を作製すると、トラップした遺伝子の発現パターンにより、さまざまなX-galの染色パターンを示す。このようにして、ジーントラップ法では、未知の遺伝子が単離され、その遺伝子発現パターンが解析され、またその遺伝子が破壊される。

5

本発明を用いれば、トランスポザーゼ遺伝子を有するトランスジェニック生物と、非自己完結型トランスポゾン含有トランスジェニック生物とを交配して、「トランスポザーゼ遺伝子およびトランスポゾン含有トランスジェニック生物」を得ることができる。ここでは、非自己完結型トランスポゾンとは、それ自身では転位が不可能なものをいう。自己完結型トランスポゾンとは、それ自身で転位が可能なものをいう。この方法によると、同様の親を交配させることにより、同一遺伝子をもつ仔哺乳動物を新たに得ることができる。この方法によれば、トランスポゾン構築物のみが導入されたことによる哺乳動物における表現型に与える影響をあらかじめ知ることができる。同様に、トランスポザーゼ構築物のみが導入されたことによる哺乳動物における表現型に与える影響をあらかじめ知ることができる。あるいは、トランスポザーゼ遺伝子およびトランスポゾンを初めから導入した、交配によらない「トランスポザーゼ遺伝子およびトランスポゾン含有トランスジェニック生物」を得ることもできる。この方法によれば親同士を交配する必要がないため、手間や時間、コスト面で効率がよい。従って、本発明では、このようなトランスジェニック生物の作製方法を適用することができる。

10
15
20

この「トランスポザーゼ遺伝子およびトランスポゾン含有トランスジェニック生物」において、トランスポゾンは転位可能な状態で含まれるため染色体上の任意の部位に転位可能であり、この転位により染色体上の任意部位の遺伝子機能を破壊、低下ないし活性化することが可能である。

25

さらに、「トランスポザーゼ遺伝子およびトランスポゾン配列含有トランスジ

ジェニック生物」と「トランスポザーゼを含まない生物」を交配して、「トランス
ポゾンを含むがトランスポザーゼ遺伝子を有しない生物」を得ることができ
る。トランスポザーゼが $LoxP$ で挟まれている場合、Creを含む生物と交
配してもよい。

- 5 好ましい実施形態では、ほぼ全細胞に (i) 少なくとも、1つのトランスポ
ザーゼ遺伝子および少なくとも1つの非自己完結型トランスポゾンあるいは自
己完結型トランスポゾン、ならびに (ii) 少なくとも1つのシグニチャー部
位を有するトランスジェニック生物」は、「GFPを任意成分として内部に含む
トランスポゾン配列 (TP) とトランスポザーゼ遺伝子 (SB) を両方有する
10 トランスジェニック生物 (以下、「TP-SB生物」ということがある)」に対
応し、「GFPを任意成分として内部に含むトランスポゾン配列 (TP) を有す
るがトランスポザーゼ遺伝子 (SB) を有しない生物 (以下、「TP生物」とい
うことがある)」と、「トランスポザーゼ遺伝子 (SB) を有するがトランスポ
ゾン配列を有しない生物 (以下、「SB哺乳動物」ということがある)」を交配
15 して得られるものである。

- 1つの実施形態において、本発明のこのトランスジェニック生物はトランス
ポゾンあるいはシグニチャー部位を有する動物幹細胞または受精卵から誘導さ
れているので、本質的に全ての細胞においてトランスポザーゼ遺伝子を有する
はずであるが、トランスポゾンが切り出される際にシグニチャー部位を残さず
20 かつ転位しないこともあり得ることから、「ほぼ全細胞」と表現することができ
る。本明細書では、「ほぼ全細胞」はこのような特別な細胞を除く全細胞を意味
する。上記生物は、その各細胞においてトランスポゾンがランダムに転位して
おり、そのため、トランスポゾンにより導入された遺伝子変異に関して個体全
体として統一的な変異が見いだされないものである。

- 25 別の実施形態において、本発明のトランスジェニック哺乳動物のうち「TP
-SB哺乳動物」と「トランスポザーゼを含まない生物」を交配して得られる

ものは、「TP-SB哺乳動物」のシグニチャー配列に基づく遺伝子変異が受精卵の段階で既に存在し、哺乳動物個体のほぼ全細胞で共通のシグニチャー部位を含むものである。

5 本発明においては、所望のトランスジェニック生物をプレスクリーニングし
得る。プレスクリーニングの方法としては、例えばジーントラップ法を用いる
ことができる (Zambrowicz et al.; Nature, 392:
608-611 (1998); Gossler et al.; Science,
244:463-465 (1989); Skallnes, WC. et al.;
Genes Dev. 6:903-918 (1992); Friedrich,
10 G. et al.; Genes Dev. 5:1513-1523 (1991))。
このように、プレスクリーニングを行うことにより遺伝子機能の解明に有望な
トランスジェニック生物を予め選抜し、その後2世代以上の交配あるいはその
他適宜の手段により、1対の染色体の両遺伝子に変異したトランスジェニック
生物を得ることができる。

15 遺伝子破壊してその表現型を解析する手法は、遺伝子機能を解明するための
有効な手段である。哺乳動物個体、特にマウスで網羅的に遺伝子破壊を起こし
表現型を解析するためには、克服しなければいけない大きな問題点が二つある。
一番目は、網羅的に遺伝子破壊を起こし表現型を目安に遺伝子機能を探る手法、
いわゆるフォワードジェネティクスが整備されていないことである。二番目
20 は、遺伝子が1対（両対立遺伝子）あるために片側の遺伝子を破壊しただけで
は表現型が現れないことである。両対立遺伝子変異を導入するためには、現在
のところ片側の遺伝子が破壊された個体同士の交配に依存している。つまり、
両対立遺伝子変異導入個体を得るための交配に長時間をかける必要性がある。

一番目の問題点は、本発明において改良されたトランスポゾンシステムでよ
25 りよく克服できる。二番目の問題点は、迅速な両対立遺伝子変異導入法により
克服できる二番目の問題点を克服するための具体的手段として、両対立遺伝子

変異を有する細胞が高頻度に現れるBloom遺伝子ノックアウトマウスを用いることができる (G. Luo et al.; Nature Genetics, 26: 424-429 (2000)). 但し、完全なBloom遺伝子ノックアウトマウスは致死性であり (N. Chester et al.; Genes and Dev., 12: 3382-3393 (1998)), 二番目の問題点を克服できない可能性がある。そこで、本発明者らは、Bloom遺伝子の発現を自由に調節できうる様なマウスをtetOFFのシステム (CT, Bondet al.; Science, 289: 1942-1946 (2000)) を用いて作製中である (図8参照)。Bloom遺伝子はDNAヘリカーゼをコードし、その活性が欠損すると、sister chromatid exchange (SCE) が起こり、同時に別のchromatidとの交換も起こる。従って、Bloom遺伝子を欠損させると、4倍体の状態で組換えが起こり、一对の遺伝子が両方とも変異した細胞を、個体の一部で生じさせる。

15 例としてBloom遺伝子のON/OFFをテトラサイクリン依存的に行うようにしておくと (A. Kistner et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 10933-10938 (1996)) T-テトラサイクリンを与えるまたは与えない時期を調節することで、時期特異的により多くの組換えを誘発し、一对の変異遺伝子を有する細胞に導くことができる。

20 従って、交配を繰り返すことなく、一对の遺伝子の変異した生物を得ることができる。時期特異的に変異を導入するには、例えば、ペレット (pellet) を持続的に生物母体に経口投与することで、一对の遺伝子の変異した胎児を得ることができる。

Bloom遺伝子を調節可能に発現させるための一例としてのテトラサイクリンレギュレータブルユニット (Tetracyclin regulatable unit) のような手段の導入は、トランスポゾンシステムと組み合

25

わぜで行う。例えば、トランスポゾンコンストラクト、トランスポザーゼ、自己完結型トランスポゾンなどが導入される受精卵等に予めB l o o m遺伝子を調節可能に発現する手段を導入しておいて交配を行う。得られたトランスポゾン転位部位が導入されたマウスに、B I o o m遺伝子の発現を抑制する手段（例えばテトラサイクリンの投与）を実施することで、トランスポゾンシステムにより得られた遺伝子の変異を両対立遺伝子に導入し、表現型の確認を迅速に行うことができる。本発明において選択マーカー遺伝子を用いない場合は、該トランスジェニック生物の細胞からDNAを抽出し、サザンプロット法により転位の有無を調べることで、スクリーニングを行ない得る。本発明によれば、動物体内で、効率のよいトランスポゾン配列の転位を達成することができる。トランスポゾンを用いた変異の導入法によれば、他の方法に比べ、多種多様な表現型をもつ生物を効率よくかつランダムに得ることが可能となる。本発明のトランスジェニック生物は、遺伝子機能研究において、多様な遺伝子変異を導入することにより、複雑な生命現象を解明するためのツールとしてきわめて有用である。

また、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 95: 10769-10773, 1998に記載されるように、細胞におけるトランスポゾンの発現頻度は細胞あたり最大で 3.5×10^{-5} 回/1世代あたりの1細胞と極めて低い。これに対して、本発明による個体でのトランスポゾン発現率は、例えば実施例においては全マウス中42%、GFP遺伝子陽性マウス中最大80%であり、著しく高いという特徴をもつ。このようにトランスポゾン発現システムが動物またはその組織、器官などの細胞集合体となることでトランスポゾンの転位効率が飛躍的に高めることが容易になったのは、本発明において初めて見出された知見である。

本発明の1実施態様によれば遺伝子機能を鮮明する手段として、ランダムにトランスポゾン構築物を導入したトランスジェニック生物群の中から、マーカ

一あるいは他の手段によりランダムに導入された変異を有する個体を見出すことが可能である。遺伝子機能を網羅的に解析するには、トランスポゾンがゲノムのより多くの部位へ転位する必要がある。本発明によれば、「ほぼ全細胞に

(i) 少なくとも1つのトランスポザージ遺伝子および少なくとも1つの非自己完結型トランスポゾンあるいは自己完結型トランスポゾンならびに (i i)

5 少なくとも1つのシグニチャー部位を有するトランスジェニック生物」を得ることができる。例えばマウスを対象とした本願実施例によれば、細胞10個当たり1個以上の割合でシグニチャー部位を導入することができ、その結果種々雑多な細胞をモザイク状にもつそのような「種マウス」が得られ、該マウスは

10 1個体当たり約1万以上の転位部位を有するとの結果を得ている。従って、異なる種マウスから変異マウスを作製することにより、約3万以上あるとされる遺伝子のほぼ全てについて網羅的に変異導入することも可能である。このように、変異を有する生物個体を解析する際、本発明では遺伝子変異の発現頻度が極めて高いので、複数の変異をもつ生物が1個体得られれば、多くの変異の機能変化を一度で分析することができ、遺伝子機能の解明を極めて効率的に行うことができる。また、変異導入の対象としてマウスを例にとると、従来のES細胞への変異導入法であれば、1つの細胞からわずか1匹のトランスジェニックマウスしか得られなかった。

15

一方、本発明のトランスジェニック生物作製方法によれば、得られた「ほぼ

20 全細胞に少なくとも1つの非自己完結型トランスポゾンおよび少なくとも1つのシグニチャー部位からなる群がら選ばれる少なくとも1種を有するトランスジェニック生物（例えばマウス）」を種マウスとすると、1匹の個体から1万種類のトランスジェニック個体を産ませることができる（図9参照）。即ち、1匹のマウスから膨大な種類の転位をもつ子が産まれるとの利点があり」、生命現象

25 を解明するために種々雑多な変異個体を得ることができる。

本発明によれば、得られたトランスジェニック生物を交配することで、転位

が固定された遺伝子解明上有用な生物を得ることが可能である。ここで「転位が固定された」とは、活性なトランスポザーゼを有さないためトランスポゾン
の転位によるシグニチャー部位数が増加しないことを意味する。具体的には、
少なくとも1つのシグニチャー部位を有しトランスポゾンが存在するがトラン
5 スポザーゼが存在しないまたは不活性である場合、少なくとも1つのシグニ
チャー部位を有するがトランスポゾンが存在しない場合のいずれかを指す。この
ようなトランスジェニック哺乳動物個体が得られれば、1個体を調べることで、
対応する1種の遺伝子機能をシンプルに解析することができる。また、特定の
変異を有する個体について、その成長過程に伴い該変異の影響を調べることが
10 できる。また、こうした生物の中で何らかの機能を欠損したものについて、例
えばスプライスアクセプターを含むトランスポゾン配列を用い、トランスポザ
ーゼをその受精卵に加えるかあるいはトランスポザーゼを有する生物と交配す
ることで該トランスポゾン配列を除去し、その結果機能が回復するかどうかを
見ることにより、特定の機能に関与する原因遺伝子を確認することができる。
15 本発明では、トランスポゾンにより変異を導入しているため、突然変異誘発物
質などを用いて変異を導入するのと比較して、どこに変異が導入されたのかを
シグニチャー配列あるいはトランスポゾン構築物由来の配列を利用してPCR
等の適当な方法により、容易に検出することができる。また、本発明の実施態
様においては、培養細胞でなく個体の生物で遺伝子変異を導入することにより、
20 個体レベルでの遺伝子機能の解析が可能である。また、生物個体を生存させた
ままの状態では操作が困難な組織に対しても、外部から手を加えることなしに、
個体体内で遺伝子変異を導入し得る。さらに、同じ組織内であっても転位部位
が異なり、従って遺伝的に異なる一群の細胞が存在するので、血液系、免疫系
などの任意の組織・臓器・器官で、増殖、分化等にお吐る細胞系譜を系統的に
25 調べることができる。

本発明によれば、本発明の新規な生物、特にマウスは、遺伝子機能解明のた

めの便利なモデルシステムを提供する。本発明のこの実施態様は、生きた動物モデルにおいて遺伝性疾患の研究のための疾患モデルシステムを提供し得る。

該システムにおいて、動物モデルに導入される疾患遺伝子としては、ヒト疾患原因遺伝子、または生物におけるその相同遺伝子が cDNA の遺伝子全長、c

- 5 DNA の遺伝子断片、ゲノム DNA の遺伝子全長、あるいはゲノム DNA の遺伝子断片であるものが挙げられる。疾患原因遺伝子は、生物に導入して、得られたトランスジェニック生物をヒト疾患モデル動物として研究に供し得るものであればいずれでも良く、特に限定されないが、ヒト疾患原因遺伝子であるのが好適である。本発明によれば、種々のエンハンサーを含むトランスポゾンが
- 10 癌原遺伝子の近傍に転位した場合、これらを包含する細胞においては結果的に癌が発現するため、これにより癌原遺伝子をスクリーニングできる。特に、トランスポゾン配列およびトランスポザーゼ遺伝子を両方含むトランスジェニック生物を用いた場合、癌原遺伝子の発現はクローナルであるため、癌は組織だけでなく全体に転移し得る。また同時に、各動物細胞内で転位による遺伝子機能
- 15 の低下、破壊ないし活性化がランダムに進行しているので、複数の癌が同一個体内で発生することも予測され、癌に関与する遺伝子機能の解明を効率よく進めることができる。さらに、同一個体内で複数の癌を認めた場合、各々の癌細胞においてトランスポゾンベクターの挿入部位が同じかどうかを調べることで、癌細胞が同一の細胞に由来しているかどうかを調べることができ、
- 20 癌の転移のメカニズム研究に寄与し得る。

本発明では、本発明のトランスジェニック生物を臓器提供用ドナーとして使用することができる。例えば、ヒトへの異種間臓器移植のドナーとして考えられる臓器として、具体的には神経細胞、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、角膜、皮膚などが挙げられる。この場合、導入される遺伝子は、例えば異種間での臓

25 器移植に拒絶反応を低減する機能を有する遺伝子あるいは生着率の上昇を期待し得る機能を有する遺伝子が好ましい。

トランスジェニック生物の作製についてはまた、米国特許第5, 464, 764号公報；米国特許第5, 487, 992号公報；米国特許第5, 627, 059号公報；特開2001-54337号公報；Gossler, A. et al. (1989), Science 244, 463-465；Wurst, W. et al. (1995), Genetics 139, 889-899；Zambrowicz, B. P. et al. (1998), Nature 392, 608-611 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86, 8932-8935, 1989；Nature, Vol. 342, 435-438, 1989；村松正實、山本雅編集、『実験医学別冊 新訂 遺伝子工学ハンドブック 改訂第3版』（1999年、羊土社発行）中特に239から256頁；相沢慎一（1995）実験医学別冊「ジーンターゲットイングーES細胞を用いた変異マウスの作製」などが挙げられるがそれらに限定されない。

本明細書において、「ノックアウト」とは、遺伝子について言及されるとき、その遺伝子を破壊（欠損）または機能不全にさせることをいう。従って、ノックアウトの概念は、トランスジェニックの中に含まれる。

本明細書において、「ノックアウト生物」とは、ある遺伝子がノックアウトされた生物（例えば、マウス）をいう。従って、ノックアウト生物の概念は、トランスジェニック生物の中に含まれる。

本明細書においてトランスジェニックの対象とされる「生物」は、トランスポゾンが作用し、そのような系が機能し得る任意の生物が含まれる。このような生物には、動物、植物、細菌などが含まれるがそれらに限定されない。

本明細書において、「動物」は、核酸配列（好ましくは遺伝子をコードする外来配列）の導入を目的とすることができるものであればどのような動物であってもよい。従って、動物には、脊椎動物および無脊椎動物が包含される。動物としては、哺乳動物（例えば、マウス、イヌ、ネコ、ラット、サル、ブタ、ウ

シ、ヒツジ、ウサギ、イルカ、クジラ、ヤギ、ウマなど)、鳥類(例えば、ニワトリ、ウズラなど)、両生類(例えば、カエルなど)、爬虫類、昆虫(例えば、ショウジョウバエなど)などが挙げられる。好ましくは、動物は、哺乳動物であり得、より好ましくは、ノックアウトを作製することが容易な動物(例えば、マウス)であり得る。別の好ましい形態では、動物は、ヒトのモデル動物として適切であることが判明している動物(例えば、サル)であり得る。ある実施形態では、動物は、非ヒト動物または非ヒト哺乳動物であり得るが、それに限定されない。例えば、ブタ、サル・ウシ・ウマ・ヤギ、ヒツジ、ネコ、イヌ、ウサギ、マウス、ラット、またはハムスター等であり、より好ましくは、マウスまたはラットである。ここで本発明の生物には、特に言及しない限り、哺乳動物個体だけでなく個体の一部および個体の有する臓器、器官も包含される。これらはヒト疾患モデルとして、また臓器移植用ドナーとして有用である。

本明細書において用いられる「植物」とは、植物界に属する生物の総称であり、クロロフィル、かたい細胞壁、豊富な永続性の胚的組織の存在、および運動する能力がない生物により特徴付けられる。代表的には、植物は、細胞壁の形成・クロロフィルによる同化作用をもつ顕花植物をいう。「植物」は、単子葉植物および双子葉植物のいずれも含む。好ましい植物としては、例えば、イネ、コムギ、トウモロコシ、オオムギ、ソルガムなどのイネ科に属する単子葉植物が挙げられる。より好ましくは、植物は、イネであり得る。イネとしては、ジャポニカ種、インディカ種のものが挙げられるがそれらに限定されない。より好ましくは、イネは、ジャポニカ種のものであり得る。本明細書において、イネの品種としては、例えば日本晴、ニホンマサリ、コシヒカリ、あきたこまち、どんとこい、ヒノヒカリなどが挙げられるがそれらに限定されない。インディカ種の品種としては、T e t e p、B a s m a t i、I R 8、湖南早などが挙げられるがそれらに限定されない。好ましい植物は作物に限られず、花、樹木、芝生、雑草なども含まれる。特に他で示さない限り、植物は、植物体、植物器

官、植物組織、植物細胞、および種子のいずれをも意味する。植物器官の例としては、根、葉、茎、および花などが挙げられる。植物細胞の例としては、カルスおよび懸濁培養細胞が挙げられる。

- イネ科の植物の例としては、*Oryza*、*Hordenum*、*Secale*、
5 *Saccharum*、*Echinochloa*、または *Zea* に属する植物が
挙げられ、例えば、イネ、オオムギ、ライムギ、ヒエ、モロコシ、トウモロコシなどを含む。

本発明の生産方法に用いられる植物は、好ましくは単子葉植物であり、より好ましくは、イネ科植物である。さらに好ましくは、イネであり得る。

- 10 上述の生物において、遺伝子の導入技術はマイクロインジェクション、核酸フラグメントと陽イオン脂質小胞体またはDNA凝縮試薬との組合せ；ならびに核酸フラグメントをウィルスベクターに導入し、そしてこのウィルスベクターを細胞と接触させること、ならびに粒子ボンバードメントおよびエレクトロポレーションから成る群より選ばれる方法を含む。

- 15 本明細書において使用され得るウィルスベクターはレトロウィルスベクター、アデノウィルスベクター、ヘルペスウィルスまたはアデノ関連ウィルスベクターからなる群より選ばれるものが挙げられるがそれらに限定されない。

- 本明細書において「レトロウイルス」とは、RNAの形で遺伝情報を有し、逆転写酵素によってRNAの情報からDNAを合成するウイルスをいう。したがって、「レトロウイルスベクター」とは、レトロウイルスを遺伝子の担い手（ベクター）として使用した形態をいう。本発明において使用される「レトロウイルスベクター」としては、例えば、*Moloney Murine Leukemia Virus* (MMLV)、*Murine Stem Cell Virus* (MSCV) にもとづいたレトロウイルス型発現ベクターなどが挙げら
20 25 れるがそれらに限定されない。

好ましくは、レトロウイルスベクターとしては、pGen-、pMSCVな

どが挙げられるがそれらに限定されない。

5 本明細書において使用される場合「ジーントラップ（法）」とは、目的の細胞に、例えば、プロモーターを欠いたレポーター遺伝子を導入し、染色体上で活性化されているプロモーターの下流に挿入された場合にのみレポーター活性が
10 検出できること利用した遺伝子の同定方法をいう。このようなジーントラップは、「ジーントラップベクター」を、真核生物の宿主染色体中に導入して、宿主遺伝子を破壊することにより達成される。レポーター遺伝子が挿入された遺伝子は、レポーターとの複合タンパク質を発現するため、そのタンパク質をモニターすることによって遺伝子を同定することが可能である。したがって、相同
15 組換えと同様に本来の遺伝子座にレポーター遺伝子が組み込まれるため、転写調節が完全なレポーター系を作ることができる。この手法を用いることによって、遺伝子破壊によって変異体を単離する手法では、得られなかった遺伝子の同定を行うことができる。したがって、本発明では、このようなジーントラップ法もまた利用することができる。

15 本明細書において「ジーントラップベクター」とは、真核生物遺伝子のmRNAが成熟mRNAとなる過程においてスプライシングを受ける現象を利用して、遺伝子中へ挿入されたベクターを選択するためのベクターである。ジーン
20 トラップベクターとしては、（１）プロモーターを有さないレポーター遺伝子のコード領域、およびスプライスアクセプター部位を含むDNA配列を含むベクター、または（２）プロモーターを有するレポーター遺伝子のコード領域、およびスプライスドナー部位を含むDNA配列を含むベクター、ならびに（３）
25 これら（１）および（２）の両方のDNA配列を含むベクターが挙げられるがこれらに限定されない。

25 上述のようなスプライスアクセプター配列を含むジーントラップベクターは、必要に応じて、ポリA付加シグナルを含んでもよい。スプライスドナー配列を含むジーントラップベクターは、必要に応じて、エンハンサー領域、および／

またはmRNA不安定化領域を含んでもよい。ポリA付加シグナルとしては、「AATAAA」が挙げられるが、これに限定されない。

本発明において使用するプロモーターとしては、MC1プロモーター、RNA pol IIプロモーターなどが挙げられるがそれらに限定されない。

5 本発明において使用されるエンハンサーとしては、ポリオーマウイルスエンハンサー (PYF441) などが挙げられるがそれらに限定されない。

本発明において使用されるスプライスドナー配列としては、マウスhprt遺伝子エキソン8スプライスドナーが挙げられるがそれらに限定されない。

10 本発明において使用されるスプライスアクセプター配列としては、ヒトbc1-2遺伝子エキソン3スプライスアクセプターが挙げられるがそれらに限定されない。

本明細書において使用される「レポーター」分子または「レポーター」遺伝子とは、細胞内において遺伝子発現の指標として使用することのできる分子 (例えば、ポリペプチド) または遺伝子をいう。そのような分子としては、公知の

15 レポータータンパク質を用いることができ、例えば、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、 β -グルクロニダーゼ (GUS)、 β -D-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、グリーン蛍光タンパク質 (GFP)、またはエクオリンなどが挙げられる。ここで、遺伝子の導入方法自体は、当該分野において公知の技術をもちいて所望の材料を用いて行うことができる。そ

20 のような場合、例えば、目的とする胚性幹細胞に、例えば、プロモーターを欠いたレポーター遺伝子 (例えば、ルシフェラーゼ遺伝子、グリーン蛍光遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ)、アルカリホスファターゼ遺伝子、Creレコンビナーゼ遺伝子など) を導入し、染色体上で活性化されているプロモーターの下流に挿入された場合にのみレポーター活性が検出する。使用され

25 るベクターはこのレポーター遺伝子のほか、選択マーカー遺伝子 (例えば、ネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性

遺伝子、レスキューマーカ―遺伝子（例えば、アンピシリン耐性遺伝子＋コリ
シンE1複製開始起点）などを含んでいてもよい。ここで、選択マーカ―遺伝
子は、ベクターが入った宿主を選択するために使用される。レスキューマーカ
―遺伝子は、ベクターをレスキューするために使用される（Joyner,
5 A. L. ed.” Gene Targeting, 2nd edition” (O
xford University Press, 2000)を参照のこと)。
上述のような技術を用いることによって、胚性幹細胞が生成される。この改変
胚性幹細胞は、遺伝子がトラップされている。ここで、トラップされていると
は、ゲノムへのトラップベクターの挿入により内在性遺伝子が破壊され、同時
10 にそのベクターによって破壊された遺伝子がマーキングされた状態をいう。

特定の配列を有するオリゴヌクレオチドの調製は、当該分野において周知の
技術を用いて行うことができ、例えば、Joyner, A. L. ed.” Gen
e Targeting, 2nd edition” (Oxford Unive
rsity Press, 2000)に記載される方法で行うことができる。
15 オリゴヌクレオチドは、必要に応じて、蛍光、放射能などで標識することがで
きる。そのような標識方法は当該分野において周知であり、本明細書において
引用される文献に記載されている。

(スクリーニング)

本明細書において「スクリーニング」とは、目的とするある特定の性質をも
20 つ生物または物質などの標的を、特定の操作／評価方法で多数を含む集団の中
から選抜することをいう。スクリーニングのために、本発明の方法または生物
を使用することができる。本発明では、種々のトランスジェニック生物が作製
されることから、任意の核酸分子およびその機能調節因子をスクリーニングす
ることができる。

25 本発明では、任意の核酸分子を本発明の核酸分子、方法またはシステムを利
用することによってスクリーニングすることができる。本発明はまた、そのよ

うなスクリーニングによって同定された化学物質またはその組み合わせを包含することが企図される。

本発明のトランスポゾンシステムは種々の分野に応用できる。例えば、1) 本発明の方法を利用して生物の染色体への遺伝子材料を効率的に挿入することができる；2) 挿入変異因子としてのトランスポゾンの利用により、生命体の成長、維持、調節および発育に関わる遺伝子の同定、単離および特性を決定することができる（例えば、Kaiserら、1995「Eukaryotic transposable elements as tools to study gene structure and function」Mobile Genetic Elements, IRL Press, pp. 69-100）；3) 生命体の成長、維持、調節および発育を調節する転写調節配列の同定、単離およびその同定することができる（例えば、Andersonら、1996, Mol. Mar. Biol. Biotech., 5, 105-113）。一例において、本発明の方法およびシステムは無菌遺伝子導入マウスを作るために利用できる。活性化遺伝子を有する同腹群を交配させ、生物的封じ込めまたは養殖魚の成長率を最大にするために無菌子孫を作ることができる。

（遺伝子治療）

本発明の用途としては、核酸フラグメントを修飾して細胞に遺伝子治療を施す遺伝子を組込むことが挙げられる。遺伝子は組織特異的プロモーターのコントロール下、または汎用プロモーター、またはその遺伝子を必要とする細胞における遺伝子の発現のための1もしくは複数のその他の発現コントロール領域のコントロール下に置く。遺伝子治療に使用される遺伝子としては、例えば、嚢胞性線維症のためのCFTR遺伝子、肺疾患のための α -1-アンチトリプシン、免疫系疾患のためのアデノシンデアミナーゼ（ADA）、血液細胞疾患のための1 \times 因子およびインターロイキン-2（IL-2）、ならびに癌治療のための腫瘍壊死因子（TNF）などが挙げられるがそれらに限定されない。

遺伝子治療に使用することが可能な遺伝子配列は公知のデータベース、例えばGenBank、DDBJ、EMBL等において検索し、入手できる。

さらに、本発明は、ライブラリーで作業するまたはそれをスクリーニングするための工程の一部として、配列の機能を評価するため、またはタンパク質発現をスクリーニングするため、または特定の細胞タイプに対する特定のタンパク質または特定の発現コントロール領域に対する効果を評価するために利用することができる。1つの実施形態において、組換え配列のライブラリー、例えばコンビナトリアルライブラリーまたは遺伝子シャフリングの生成物を本発明の核酸フラグメントの中に組込んで、一定の逆方向反復配列の間に配置された様々な核酸配列を有する核酸フラグメントのライブラリーを作る。次いでこのライブラリーを前述の通りSBタンパク質と一緒に細胞の中に導入する。

本発明の利点は、それが逆方向反復配列の間に配置される介在核酸配列のサイズを著しく制約しないというトランスポゾントランスジェニック生物作製システムの利点をフルに活用することができることである。このSBタンパク質は1.3キロベース(kb)～約5.0kbのトランスポズンを組込むのに利用されており、marinerトランスポザーゼは約13kbまでのトランスポズンを移動させた。SBタンパク質を用いて細胞のDNAの中に組込むことのできる核酸配列のサイズにわかっている制限はない。

20 発明を実施するための最良の形態

以下に好ましい実施形態の説明を記載するが、この実施形態は本発明の例示であり、本発明の範囲はそのような好ましい実施形態に限定されないことが理解されるべきである。

25 1つの局面において、本発明は、トランスポズンをコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子であって、少なくとも1つの核酸がメチル化されて

いる、単離された核酸分子を提供する。このような核酸分子は、予想外に、宿主内でのトランスポゾン活性を保持し、活性化することができるという優れた効果を持つ。このような効果により、本発明は、どのような生物であってもトランスジェニック生物を作ることが可能になったという優れた有用性を有する。

- 5 好ましい実施形態において、本発明の核酸分子は、所望の遺伝子をコードする核酸配列を有する。ここで含まれる所望の遺伝子は、どのような遺伝子であってもよく、その遺伝子は、核酸分子が使用される用途によって適宜選択することができる。

- 10 好ましい実施形態において、本発明において使用される核酸分子におけるメチル化は、少なくとも、CG配列におけるCにおいて存在することが有利であり得る。理論に束縛されないが、CG配列にメチル基が存在することによって、染色体がヘテロクロマチン化するという現象が生じることが考えられ、トランスポゾンの転位効率に多大な効果を与えるからである。

- 15 本発明において使用されるトランスポゾンは、どのような形態であってもよいが、好ましくは、DNA型が用いられる。DNA型であれば、メチル化の効果が発揮されやすいからである。好ましくは、本発明において使用されるトランスポゾンはTc1/mariner型に属する。この型に属するトランスポゾンは、染色体内に組み込まれたときに染色体がヘテロクロマチン化するという現象が生じることが考えられ、トランスポゾンの転位効率に多大な効果を与えるからである。
- 20

もっとも好ましい実施形態では、本発明によって用いられるトランスポゾンはSleeping Beautyを含む。このトランスポゾンは、本明細書において他の場所において詳述したように、種の壁を簡単に越えて利用することが可能であるからである。

- 25 好ましくは、本発明の核酸分子では、所望の遺伝子は、トランスポゾンに作動可能に連結されるか、または細胞内に導入されるとトランスポゾンに作動可

能に連結され得るように構成される。トランスポゾンが作動するように連結するには、例えば、逆方向反復配列を適宜配置したりすることが挙げられるがそれらに限定されない。

好ましい実施形態では、本発明の核酸分子は、外来遺伝子を宿主内に導入するために使用される。外来遺伝子を宿主内に導入することは、たとえ、本発明の核酸分子がインビトロで効果が見られたとしても予想すらできない効果である。ましてや、メチル化の効果がまったくわかっていない状況では、予想の鍵すらないことに鑑みると、本発明のメチル化による外来遺伝子の宿主ない導入の効率化は格別の効果であるといえる。

- 10 本明細書において、本発明が対象とする生物（宿主）は、トランスポゾンが作動する限りどのような生物であってもよく、真核生物を含むがそれに限定されない。好ましくは、本発明が対象とする宿主は、哺乳動物（例えば、マウス、ラットなどのげっ歯類；霊長類など）を含むがそれに限定されない。トランスポゾンが作動するかどうかは、ここの動物を実験することによって確認することが
- 15 ができる。

本発明の好ましい実施形態において、本発明の核酸分子では、その核酸分子が挿入されるゲノム上の位置においてトランスポザーゼが作用することが有利である。このように構成されることによって、遺伝子の転位がスムーズに行われることができる。

- 20 別の局面において、本発明は、トランスポゾンにコードする核酸配列を有する遺伝子カセットであって、該核酸配列は、少なくとも1つの核酸がメチル化されている、遺伝子カセットを提供する。ここで、含まれる核酸分子は、上述のような特徴を有し得る。本明細書において「遺伝子カセット」には、他の要素が付着していてもよい。

- 25 別の局面において、本発明は、トランスポゾンにコードする核酸配列、および所望の遺伝子をコードする核酸配列を有するベクターであって、該核酸配列

は、少なくとも1つの核酸がメチル化されている、ベクターを提供する。ここで、トランスポゾンにコードする配列およびメチル化については、本明細書の他の場所において記載されている。ベクターは通常環状をしているがそれに限定されない。ベクターには、遺伝子の転写、翻訳、発現を調節する要素が付着されていてもよい。そのような要素は、好ましくは作動可能に連結され得る。

好ましくは、このベクターは、外来遺伝子を宿主内に導入するために使用される。本発明のベクターは、従来不可能であったかまたは困難であった生物種でさえ、トランスジェニック生物を作製することが可能になったという効果が達成される。特に、SBではトランスジェニック生物が作製できないとされていた哺乳動物において、ベクターを用いた形態でトランスジェニック生物を作製することができるようになったということは、簡便に外来遺伝子を挿入することができる系が利用可能になったことを意味する。したがって、このような系の有用性は、多大である。

本発明のベクターは、核酸配列が挿入されるゲノム上の位置においてトランスポザーゼが作用するように構成することができる。本発明において、「シグニチャー部位」とは、トランスポゾン配列が切り出されて転位した結果として現れる部位を指す。例えば、本発明でSBトランスポゾンを用いた場合、シグニチャー部位は、標的配列であるTAの重複の間にトランスポゾン末端配列の3塩基が挿入された「TAcagTA」あるいは「TActgTA」という配列を含む。但し、トランスポゾンが移動してもシグニチャー部位が上記特定の完全な配列を有しない場合もあり、本発明においては、こうした不完全な配列を含む部位もシグニチャー部位と見なすことができる。

別の実施形態において、本発明では、本発明の核酸配列が挿入されるゲノム上の位置においてトランスポザーゼが作用するようにベクターが構築される。このような構築は、本発明においてトランスポゾンにコードする配列部分が少なくともメチル化されていることによって達成され得る。

別の実施形態において、本発明は、ゲノム上に挿入される外来核酸分子に対してトランスポザゼを作用させるための組成物を提供する。この組成物は、トランスポゾンにコードする核酸配列、および該外来核酸分子を含み、該トランスポゾンにコードする配列はメチル化されていることを特徴とする。ここで、
5 外来核酸分子はメチル化されていてもメチル化されていなくてもよい。

別の局面において、本発明は、トランスポゾンにコードする核酸配列、および所望の遺伝子をコードする核酸配列を有する核酸分子を含む細胞を提供する。ここで、この核酸配列は、少なくとも1つの核酸がメチル化されていることが特徴である。このような細胞を用いることによって、トランスジェニック生物
10 を容易に作製することができることが本発明によって判明した。従って、本発明は格別の有用性を有する。本発明の細胞に含まれ得る核酸分子は、上述のトランスポゾンにコードする配列を含むものであれば、どのようなものであってもよい。ただし、そのような配列は、保持される細胞において機能的であることが好ましい。好ましくは、そのような細胞は、外来遺伝子を宿主内に導入す
15 るために使用される。このような宿主は、その細胞と同じ種類であることが好ましいが必ずしも必要というわけではない。

本発明の細胞は、どのような種類の細胞であってもよいが、好ましくは、真核生物細胞を含み、より好ましくは、哺乳動物細胞を含み、さらに好ましくは、げっ歯類細胞を含むがそれらに限定されない。より好ましくは、マウス、ラッ
20 トなどのモデル動物のものが有用である。むしろ、本発明の細胞は、導入する核酸分子の性質、目的、核酸分子が導入されるべき宿主との関係で決定されるべきである。本発明の細胞に含まれる核酸分子は、本発明のベクターであってもよい。

別の局面において、本発明は、トランスポゾンにコードする核酸配列、および所望の遺伝子をコードする核酸配列を有する核酸分子を含む組織を提供する。
25 ここで、この核酸配列は、少なくとも1つの核酸がメチル化されていることが

特徴である。このような組織を用いることによって、トランスジェニック生物を容易に作製することができることが本発明によって判明した。従って、本発明は格別の有用性を有する。本発明の組織に含まれ得る核酸分子は、上述のトランスポゾンにコードする配列を含むものであれば、どのようなものであってもよい。ただし、そのような配列は、保持される組織において機能的であることが好ましい。好ましくは、そのような組織は、外来遺伝子を宿主内に導入するために使用される。このような宿主は、その組織と同じ種類であることが好ましいが必ずしも必要というわけではない。

本発明の組織は、どのような種類の組織であってもよいが、好ましくは、真核生物組織を含み、より好ましくは、哺乳動物組織を含み、さらに好ましくは、げっ歯類組織を含むがそれらに限定されない。より好ましくは、マウス、ラットなどのモデル動物のものが有用である。むしろ、本発明の組織は、導入する核酸分子の性質、目的、核酸分子が導入されるべき宿主との関係で決定されるべきである。本発明の組織に含まれる核酸分子は、本発明のベクターであってもよい。

別の局面において、本発明は、トランスポゾンにコードする核酸配列、および所望の遺伝子をコードする核酸配列を有する核酸分子を含む生物を提供する。この生物では、上記核酸配列は、少なくとも1つの核酸がメチル化されていることが特徴である。本発明の生物に含まれ得る核酸分子は、上述のトランスポゾンにコードする配列を含むものであれば、どのようなものであってもよい。ただし、そのような配列は、保持される生物において機能的であることが好ましい。好ましくは、そのような生物は、外来遺伝子を宿主内に導入するために使用される。このような宿主は、その生物と同じ種類であることが好ましいが必ずしも必要というわけではない。このような生物は、トランスジェニック生物を作製するために有用である。

本発明の生物は、どのような種類の生物であってもよいが、好ましくは、真

核生物生物を含み、より好ましくは、哺乳動物生物を含み、さらに好ましくは、げっ歯類生物を含むがそれらに限定されない。より好ましくは、マウス、ラットなどのモデル動物のものが有用である。むしろ、本発明の生物は、導入する核酸分子の性質、目的、核酸分子が導入されるべき宿主との関係で決定されるべきである。本発明の生物に含まれる核酸分子は、本発明のベクターであつてもよい。

- 5 好ましい実施形態において、本発明の生物は、所望の遺伝子とその生物に由来しないものであることが好ましい。そのような場合、所望の遺伝子は、外来遺伝子という。外来遺伝子として導入されるものは、どのようなものでもよく、
- 10 目的の遺伝子によって変動し得る。

- 別の局面において、本発明は、トランスジェニック生物を作製するための方法に関する。この方法は、A. トランスポゾンにコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子を提供する工程； B. 該核酸分子で、所望の生物の生殖細胞を形質転換する工程； C. 該生殖細胞において該トランスポゾンにコードする核酸配列がメチル化している個体を選択する工程； D. 形質転換された該生殖細胞を用いて生物を再生する工程、を包含する。
- 15

- トランスポゾンにコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子を提供することは、当該分野において公知であり、あるいは、周知である技術を用いて達成され得る。該核酸分子で、所望の生物の生殖細胞を形質転換することもまた、当該分野における周知技術（例えば、本明細書において記載されるような遺伝子組み換え技術）を用いて行うことができる。生殖細胞においてトランスポゾンにコードする核酸配列がメチル化している個体を選択することもまた、当該分野において周知の方法を用いて行うことができる。具体的には、この生殖細胞から核酸分子（例えば、DNA）をメチル化が破壊されないように取り出し、その核酸分子を脱メチル化し、質量が変化するかどうか、およびそのメチル化されている部分の配列を必要に応じて決定することによって行うことが
- 20
- 25

できる。形質転換された生殖細胞を用いて生物を再生するもまた、植物に応じて適宜適切な方法を当業者は選択することができる。

好ましい実施形態において、本発明のトランスジェニック生物が対象とする生物は、真核生物である。本発明におけるトランスポゾンのメチル化の効果がより発揮されやすいからである。

別の好ましい実施形態において、本発明のトランスジェニック生物が対象とする生物は、哺乳動物を含む。本発明におけるトランスポゾンのメチル化の効果がより発揮されやすいからである。ここで、より好ましくは、この哺乳動物は、げっ歯類動物であり、より好ましくは、マウス、ラットなどのモデル動物である。

別の局面において、本発明は、トランスジェニック生物を作製するための方法を提供する。この方法は、A. トランスポゾンをコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子であって、該核酸配列は、少なくとも1つの核酸分子がメチル化されている、単離された核酸分子を提供する工程；B. 該核酸分子で、所望の生物の生殖細胞を形質転換する工程；ならびにC. 形質転換された該生殖細胞を用いて生物を再生する工程、を包含する。

トランスポゾンをコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子であって、該核酸配列は、少なくとも1つの核酸分子がメチル化されている、単離された核酸分子を提供する工程は、本明細書において上述されたように、十分に説明されており、当該分野において周知の技術を用いて行うことができる。

本発明の方法において、核酸分子で、所望の生物の生殖細胞を形質転換することもまた、当該分野において周知の技術を用いて実施することができる。

本発明の方法において、形質転換された該生殖細胞を用いて生物を再生することもまた、生物に応じて適宜適切な方法を選択することによって、当業者は容易に実施することができる。

別の好ましい実施形態において、本発明のトランスジェニック生物が対象と

する生物は、哺乳動物を含む。本発明におけるトランスポゾンのメチル化の効果がより発揮されやすいからである。ここで、より好ましくは、この哺乳動物は、げっ歯類動物であり、より好ましくは、マウス、ラットなどのモデル動物である。本発明は、このように、モデル動物を、容易に、ほぼ自動的に確率の
5 高い方法で、トランスジェニック体とすることができるようになった。従って、本発明は、従来技術にはない格別な効果を有する。

別の局面において、本発明はまた、トランスジェニック生物を作製するためのキットを提供する。ここで、このキットでは、A. トランスポゾンをコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子であって、該核酸配列は、少なく
10 とも1つの核酸分子がメチル化されている、単離された核酸分子；B. トランスポザアーゼが包含される。

本発明のキットに含まれる核酸分子は、本明細書において上述したように、トランスポゾンをコードする部分がメチル化されており、そのような核酸分子は、天然由来またはメチル化酵素によって人工的に作製することができる。また、トランスポザアーゼは、キットに含まれるトランスポゾンに対して作動する
15 ことができるものが使用され得る。

1つの実施形態において、本発明のキットには、核酸分子およびトランスポザアーゼの使用法を記載する説明書が備えられる。この説明書は、紙媒体であってもよいが、伝送媒体（例えば、ネットワーク上の情報）であってもよい。この説明書には、核酸分子の扱い、形質転換法、培養法、再生法、トランスポゾンのインキュベーション法など、トランスジェニック生物に関する種々のプロトコルが記載されている。記載は、単言語であってもよいが、二言語以上の言語が併記されていてもよい。

別の局面において、本発明は、トランスポゾンをコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子であって、該核酸配列は、少なくとも1つの核酸がメチル化されている、単離された核酸分子の、トランスジェニック生物の作製の
25

ための使用に関する。このようなメチル化された核酸分子の、トランスジェニック生物への使用は従来知られておらず、自明ではない概念である。このような核酸分子に関する説明は、本明細書において上述したとおりであり、種々の改変が可能である。

- 5 本明細書において引用された、科学文献、特許、特許出願などの参考文献は、その全体が、各々具体的に記載されたのと同じ程度に本明細書において参考として援用される。

- 10 以上、本発明を、理解の容易のために好ましい実施形態を示して説明してきた。以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、上述の説明および以下の実施例は、例示の目的のみに提供され、本発明を限定する目的で提供したのではない。従って、本発明の範囲は、本明細書に具体的に記載された実施形態にも実施例にも限定されず、請求の範囲によってのみ限定される。

実 施 例

- 15 以下に実施例を示して本発明をさらに詳しく説明するが、この発明は以下の例に限定されるものではない。以下の実施例において用いられる試薬などは、例外を除き、Sigma (St. Louis, USA)、和光純薬 (大阪、日本)、などから市販されるものを用いた。動物の取り扱いは、大阪大学医学部において規定される規準を遵守して行った。本発明で用いる発現ベクターの作製方法
- 20 を具体例を挙げて説明する。なお、このような例で用いられる出発プラスミド、プロモーター等の構成要素を同等のもので置き換えて実施することは当業者にとって容易である。

- 25 以下、本発明の内容を実施例を用いてより具体的に説明するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

(方法)

・サザンプロット分析

ゲノムDNAは、制限酵素で消化され、0.7%アガロースゲルで分画し、HyBond・N+ナイロンメンブレン (Amersham) に移した。EGFPを含むpCX・

- 5 EGFP (Okabe M. et al., FEBS Lett. 407, 313-9 (1997)) の0.7 kb EcoRI断片をトランスポゾン特異的バンドを検出するためのプローブとして使用した。ハイブリダイゼーション及び洗浄を標準的な方法 (J. Sambrook et al. 前出) (1989)) により行った。トランスジェニックマウスのトランスポゾンコピー一致を評価す
10 るために、テイルDNAのバンドをBioimaging systemを用いてトランスポゾンの単一コピーを含むES細胞クローンに由来するゲノムDNAのものと比較した。

PCR分析

- 15 トランスポゾンの切り出しは、以下のプライマーセットを用いたPCRにより検出した：TgTP-2L, 5' -ACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACG-3' (配列番号7) およびTgTP-1U, 5' -GACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATC-3' (配列番号6)。各プライマーは、それぞれpTransCX-GFP:NeoのIR/DR (R) およびIR/DR (L) の外側に位置する。PCRは、HotStarTaq system (Qiagen) を用い、以下の条件下に行った：
- 20

95℃15分、50サイクル (94℃1分、59℃1分、72℃1分)、次いで最終工程で72℃10分の1サイクル

トランスジェニックマウスの遺伝子型は、以下のプライマー対を用いて決定

- 25 した：

GFP遺伝子に関して (EGFP-1U, 5' -CACGCTGGTGAC

CAGCCTGACCTA3' およびEGFP-1L, 5' -CTTGATG
CCGTTCTCTGCTTGTCG-3') および

SBトランスジーンに関して (SB-2U, 5' -TCCTAGAGATG
AACGTACTTTGGT-3' およびSB1L, 5' -ATCCAGAA
5 AATTTTCCTTGCTCATG-3')。

PCR条件は、アニーリング温度を55℃とし、サイクル数を30とした以
外は、上記25' と同じであった。得られたPCR産物は、GFP遺伝子に関
し313bpおよびSBトランスジーンに関し466bpであった。トランス
ポゾンの新規組込部位でのブランキング配列は、既述のようにPCR増幅した
10 (Ivics, Z. et al., Cell 91, 501-10 (1997))。
PCR産物はダイターミネーターおよびABI 373A DNA配列決定機
(Applied Biosystems) を用いて直接配列決定した。

GFP発現の測定

出生直後のマウスの尾の先端を切除し、直ちにGFP-specified
15 Filter (オリンパス、東京、日本) およびオリンパス蛍光倒立顕微鏡を
用いてx40の倍率で蛍光強度を観察する。尾全体にGFP発現を有するマウ
スをポジティブと判定した。

(実施例1：一過性トランスポゾン切り出しアッセイ)

20 まず、本実施例において、トランスポゾンをコードする配列のメチル化が一
過的に切り出し能を上げるかどうかを確かめた。

(方法)

トランスポゾンDNA (pTransCX-EGFP; neo, Horie
25 et al., 2001, Proc Natl Acad Sci U S
A.; 98: 9191-6) を、SssI CpGメチラーゼ (New Eng

land Biolabs; 50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 7.9, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 160 μM SAM, 0.2 U/μl Sss I) を用いてあらかじめメチル化しておいた。メチル化自体の確認はメチル化感受性 Not I で消化されないことを確認することによって行った。

次に、マウス赤白血病細胞 (MEL 細胞、J. Mol. Biol. 292: 779-785, 1999) に、トランスポゾン DNA と Sleeping Beauty (SB) 転位酵素 (PCMV-SB、P. Hackett 博士より入手) とともに導入した。細胞から (DNeasy Tissue Kit, QIAGEN) を用いて全 DNA を抽出し、プラスミドベクター上にプライマーを用いて PCR (TgTP-1U、TgTP-2L (前出の配列)) を行い、切り出し反応が起こった場合に増幅される 358 bp の PCR 産物を検出した。検出は、アガロースによる電気泳動の後、エチジウムブロマイドによる染色によって行った。対象としてサイズマーカーも電気泳動した。切り出しシステムの構成例を図 1 a に示す。

(結果)

本実施例の結果を図 1 b に示す。写真からも明らかなように、メチル化したトランスポゾンを転位酵素とともに導入した細胞において、メチル化していないトランスポゾンよりも顕著に高頻度に切り出し反応が起きていたことが明らかになった。図中、CAG は、CAG プロモーターを示し、EGFP は緑色蛍光タンパク質を示し、pA はポリ A 付加シグナルを示す。L は左 IR/DR を示し、R は右 IR/DR を示す。M は、メチル化を示し、N は非メチル化を示す。NC はネガティブコントロール (MEL 細胞ゲノム DNA) を示す。

従って、メチル化することによって、トランスポゾンにおいて顕著な効果が

奏されることが明らかになった。

(実施例 2 : マウスゲノムの同一遺伝子座にメチル化または非メチル化トランスポゾンを含む細胞の樹立)

- 5 次に、細胞レベルでメチル化の転位活性に対する効果があるかどうかを実証した。

(方法)

- 2つの逆向きの *loxP* 配列の間にトランスポゾンを配置したプラスミドベクター (PBS185) を構築し、*SssI* CpGメチラーゼによりトランスポゾンをコードする配列をメチル化した。次に、このプラスミドDNAと *Cre* 組み換え酵素発現ベクターを、逆向きの *loxP* 配列の間にハイグロマイシン耐性遺伝子とヘルペスウイルスチミジンキナーゼの融合遺伝子 (HYTK) を、外来遺伝子 (トランスジーン) として有する MEL 細胞 (株: RL5、RL6、E. E. Bouhassira, J. Mol. Biol. 292: 77
- 10 9-785, 1999) に導入した。*Cre* 組み換え酵素によりプラスミドとゲノム上の *loxP* との間で組み換えが起こり、トランスポゾンをゲノムの特定部位に有する細胞を樹立した。これによって、ゲノム上の同一部位において、メチル化が及ぼす切り出し反応の効率化を図ることができた。樹立した細胞に *SB* 転位酵素を導入し、切り出し反応を実施例 1 に記載のように行って PCR
- 15 により検出した。この実験フローチャートを図 2 a に示す。図 1 a では、黒の矢は *loxP* 部位を示し、白およびグレイの矢は PCR プライマーを示す。CMV は CMV プロモーターを示す。

(結果)

- 25 組み換えが正しく行われたことを示す結果をサザンプロットとして図 2 b に示す。この図には、右側に各株の制限酵素地図を示す。クローン 5M1、5M

2、5M3は、RL5由来のメチル化トランスポゾンを導入した細胞株であり、クローン5N1、5N2、5N3は、RL5由来の非メチル化トランスポゾンを導入した細胞株を示す。また、6M1は、RL6由来のメチル化トランスポゾンを導入した細胞株を示す。6N1は、RL6由来の非メチル化トランスポ
5 ゾンを導入した細胞株を示す。予想されたサイズのバンドが検出された。従って、Cre-loxPを介した組換えが正しく起こったことが示された。ここでは、プローブとしてEGFPを用いた。。

また、導入したメチル化および非メチル化が維持されていることも確認した。
10 その結果を図2cに示す。実験は、メチル化感受性制限酵素HpaII、New England Biolabs)を用いたサザンプロット分析を行った。
左に方向Aおよび右に方向Bの制限酵素地図およびサザンプロット分析の結果を示す。いずれの場合も、バンドパターンより導入したメチル化は維持されており、非メチル化の場合は新たなメチル化が導入されていないことが確認さ
15 れた。

(実施例3：マウスゲノムの同一部位においてDNAメチル化がトランスポゾン切り出し反応に対して及ぼす影響)

実施例2で樹立した細胞株にSB転位酵素(PCMV-SB、P. Hackett、U. of Minnesotaより入手)を導入し、48時間後にゲ
20 ノムDNAを回収した。ゲノムの回収は、ゲノム抽出キット(DNeasy Tissue Kit, QIAGEN)を用いて行った。nested PCR
によってトランスポゾンの切り出しを検出した。各細胞株に対して10回のPCR反応を行った。1st PCRにおいて1μgのゲノムDNAを鋳型に用
25 いて反応を行った。用いたプライマーを示す：

1-1) TgTP-1U (配列番号6)

1-2) T_gTP-2L (配列番号7)

2-1) T_gTP-2U (TCTATCGCCTTCTTGACGAGTTC
TTCTGAG; 配列番号8) (2nd PCR; nested PCR)

2-2) T_gTP-3L (CAAGCGCGCAATTAACCCTCACT
5 AAAGG; 配列番号9) (2nd PCR; nested PCR)

この結果得られた試料の1 μ lをnested PCRの鋳型として用いて
次の実験を行った。ネガティブコントロール (NC) として、各細胞株のゲノ
ムDNAを用いた。メチル化を導入したトランスポゾンにおいて、切り出し反
応の頻度が顕著に上昇 (少なくとも10倍以上) していることが明らかになっ
た。

このような結果から、トランスポゾンをコードする部分のメチル化によって、
トランスポゾンの切り出し反応が促進されることが実証された。

(実施例4: トランスポゾンのゲノムへの挿入に及ぼすメチル化の効果)

15 この実施例では、本発明者らは、トランスポゾンのプラスミドDNAからゲ
ノムへの挿入を検出を行った。プロモータートラップ型トランスポゾンを構築
した。この構築方法を以下に簡便に示す。XhoI断片 (pROSA β geo
由来) をEcoRI-BamHI断片 (pTransCX-GFP) と置換す
る。

20 マウスゲノムの遺伝子内部にトラップ型トランスポゾンを挿入し、アミノ酸
の読み枠が一致すれば β -geo (pROSA β geo (Genes & Dev
elopment 5:1513-1523, 1991) が発現し、細胞が抗
生物質G418 (Geneticin, Invitrogen) に対して耐性
となる仕組みを利用した。ここで使用したプラスミドの構造を図4aに示す。

25 図4aにおける略号は、SA: スプライス・アクセプター、 β -geo: β -
galとネオマイシン耐性遺伝子との融合遺伝子

プロモータートラップ型トランスポゾン⁵をS s s I CpGメチラーゼでメチル化し、SB転位酵素とともにマウス胚性幹細胞(ES細胞)(RIES細胞、A, Nagy)に導入した。導入後、G418によって7日間選択を行った。メタノール固定の後、ギムザ(Nakarai Tesque、熊本、日本)染色した。

その結果を図4bに示す。シャーレ上の青色斑点の数から明らかなように、非メチル化トランスポゾンに比べて、メチル化トランスポゾンによって顕著にG418耐性コロニーが上昇していることが判明した。

10 従って、トランスポゾンのゲノムへの挿入に対してメチル化が効率を顕著に上昇していることが実証された。

(実施例5：トランスジェニックマウスの作製)

実施例4に示されるような系を用いて、トランスジェニックマウスを作製した。手短に述べると、実施例4で得たES細胞を胚盤胞に打ち込み、それを偽妊娠マウスの子宮に戻してマウスを誕生させた。このマウスでも、トランスポゾンのゲノムへの挿入に対してメチル化が効率を顕著に上昇させることが実証された。

20 (実施例6：天然における例)

次に、メチル化がトランスジェニック生物の生産に有用であることを実証した。手短に述べると、メチル化されているトランスポゾンDNAとトランスポザンRNAを同時に受精卵に打ち込むことによってマウスを作製した。このマウスでも、トランスポゾンのゲノムへの挿入に対してメチル化が効率を顕著に上昇させることが実証された。

(実施例 7 : 別のトランスポゾンでの例)

次に、実施例 1 において使用した SB 系の代わりに T c 1 / m a r i n e r の一つとして、T c 1 (アクセッション番号 X 0 1 0 0 5) を用いて、実施例 1 ~ 3 と同様の実験を行った。このマウスでも、トランスポゾンのゲノムへの
5 挿入に対してメチル化が効率を顕著に上昇させることが実証された。

(実施例 8 : 別のトランスポゾンでの例)

次に、実施例 1 において使用した SB 系の代わりに m i n o s - 2 (アクセ
10 ュッション番号 Z 2 9 0 9 8) を用いて実施例 1 ~ 3 と同様の実験を行った。こ
このマウスでも、トランスポゾンのゲノムへの挿入に対してメチル化が効率を顕
著に上昇させることが実証された。

以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、
本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであること
15 が理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その
内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書
に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

産業上の利用可能性

20 本発明を用いれば、トランスジェニック生物 (特に、哺乳動物のような脊椎
動物) を効率よく作製することができるようになった。このような生物は、モ
デル動物、スクリーニング、薬理試験などで非常に有用である。

請求の範囲

1. トランスポゾンにコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子であって、該核酸配列は、少なくとも1つの核酸がメチル化されている、単離された核酸分子。
5
2. さらに、所望の遺伝子をコードする核酸配列を有する、請求項1に記載の単離された核酸分子。
- 10 3. 前記メチル化は、少なくとも、CG配列におけるCにおいて存在する、請求項1に記載の単離された核酸分子。
4. 前記トランスポゾンはDNA型である、請求項1に記載の単離された核酸分子。
15
5. 前記トランスポゾンはTc1/mariner型に属する、請求項1に記載の単離された核酸分子。
6. 前記トランスポゾンはSleeping Beautyを含む、請求項
20 1に記載の単離された核酸分子。
7. 前記所望の遺伝子は、前記トランスポゾンに作動可能に連結されるか、または細胞内に導入されると該トランスポゾンに作動可能に連結され得る、請求項2に記載の単離された核酸分子。
25
8. 外来遺伝子を宿主内に導入するために使用される、請求項1に記載の単

離された核酸分子。

9. 前記宿主は、真核生物を含む、請求項 8 に記載の単離された核酸分子。

5 10. 前記宿主は、哺乳動物を含む、請求項 8 に記載の単離された核酸分子。

11. 前記宿主は、げっ歯類を含む、請求項 8 に記載の単離された核酸分子。

10 12. 前記核酸分子が挿入されるゲノム上の位置においてトランスポザーゼが作用する、請求項 1 に記載の単離された核酸分子。

13. トランスポゾンにコードする核酸配列を有する遺伝子カセットであつて、該核酸配列は、少なくとも 1 つの核酸がメチル化されている、遺伝子カセット。

15

14. トランスポゾンにコードする核酸配列、および所望の遺伝子をコードする核酸配列を有するベクターであつて、該核酸配列は、少なくとも 1 つの核酸がメチル化されている、ベクター。

20

15. 前記メチル化は、少なくとも、CG 配列における C において存在する、請求項 14 に記載のベクター。

16. 前記トランスポゾンは DNA 型である、請求項 14 に記載のベクター。

25

17. 前記トランスポゾンは Tc1/mariner 型に属する、請求項 14 に記載のベクター。

18. 前記トランスポゾンにSleeping Beautyを含む、請求項14に記載のベクター。

5 19. 前記所望の遺伝子は、前記トランスポゾンに作動可能に連結されるか、または細胞内に導入されると該トランスポゾンに作動可能に連結され得る、請求項14に記載のベクター。

10 20. 外来遺伝子を宿主内に導入するために使用される、請求項14に記載のベクター。

21. 前記細胞は、真核生物細胞を含む、請求項20に記載のベクター。

22. 前記細胞は、哺乳動物細胞を含む、請求項20に記載のベクター。

15

23. 前記細胞は、げっ歯類細胞を含む、請求項20に記載のベクター。

24. 前記核酸配列が挿入されるゲノム上の位置においてトランスポザゼが作用する、請求項14に記載のベクター。

20

25. ゲノム上に挿入される外来核酸分子に対してトランスポザゼを作用させるための組成物であって、該組成物は、トランスポゾンにコードする核酸配列、および該外来核酸分子を含み、該トランスポゾンにコードする配列はメチル化されている、組成物。

25

26. トランスポゾンにコードする核酸配列、および所望の遺伝子をコード

する核酸配列を有する核酸分子を含む細胞であって、該核酸配列は、少なくとも1つの核酸がメチル化されている、細胞。

27. 前記メチル化は、少なくとも、CG配列におけるCにおいて存在する、
5 請求項26に記載の細胞。

28. 前記トランスポゾンとはDNA型である、請求項26に記載の細胞。

29. 前記トランスポゾンはTc1/mariner型に属する、請求項2
10 6に記載の細胞。

30. 前記トランスポゾンはSleeping Beautyを含む、請求
項26に記載の細胞。

15 31. 前記所望の遺伝子は、前記トランスポゾンに作動可能に連結されるか、
または細胞内に導入されると該トランスポゾンに作動可能に連結され得る、請
求項26に記載の細胞。

32. 外来遺伝子を宿主内に導入するために使用される、請求項26に記載
20 の細胞。

33. 前記細胞は、真核生物細胞を含む、請求項26に記載の細胞。

34. 前記細胞は、哺乳動物細胞を含む、請求項26に記載の細胞。

25

35. 前記細胞は、げっ歯類細胞を含む、請求項26に記載の細胞。

36. トランスポゾンにコードする核酸配列、および所望の遺伝子をコードする核酸配列を有する核酸分子を含む組織であって、該核酸配列は、少なくとも1つの核酸がメチル化されている、組織。

5

37. 前記メチル化は、少なくとも、CG配列におけるCにおいて存在する、請求項36に記載の組織。

38. 前記トランスポゾンはDNA型である、請求項36に記載の組織。

10

39. 前記トランスポゾンはTc1/mariner型に属する、請求項36に記載の組織。

15

40. 前記トランスポゾンはSleeping Beautyを含む、請求項36に記載の組織。

41. 前記所望の遺伝子は、前記トランスポゾンに作動可能に連結されるか、または細胞内に導入されると該トランスポゾンに作動可能に連結され得る、請求項36に記載の組織。

20

42. 外来遺伝子を宿主内に導入するために使用される、請求項36に記載の組織。

43. 前記組織は、真核生物組織を含む、請求項42に記載の組織。

25

44. 前記組織は、哺乳動物組織を含む、請求項42に記載の組織。

45. 前記組織は、げっ歯類組織を含む、請求項42に記載の組織。

5 46. トランスポゾンにコードする核酸配列、および所望の遺伝子をコードする核酸配列を有する核酸分子を含む生物であって、該核酸配列は、少なくとも1つの核酸がメチル化されている、生物。

47. 前記メチル化は、少なくとも、CG配列におけるCにおいて存在する、請求項46に記載の生物。

10

48. 前記トランスポゾンはDNA型である、請求項46に記載の生物。

49. 前記トランスポゾンはTc1/mariner型に属する、請求項46に記載の生物。

15

50. 前記トランスポゾンはSleeping Beautyを含む、請求項46に記載の生物。

20 51. 前記所望の遺伝子は、前記トランスポゾンに作動可能に連結される、請求項46に記載の生物。

52. 前記生物は、真核生物を含む、請求項46に記載の生物。

53. 前記生物は、哺乳動物を含む、請求項46に記載の生物。

25

54. 前記生物は、げっ歯類を含む、請求項46に記載の生物。

5 5. 前記所望の遺伝子は、前記生物に由来しない、請求項 4 6 に記載の生物。

5 5 6. トランスジェニック生物を作製するための方法であって、

A. トランスポゾンにコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子を提供する工程；

B. 該核酸分子で、所望の生物の生殖細胞を形質転換する工程；

10 C. 該生殖細胞において該トランスポゾンにコードする核酸配列がメチル化している個体を選択する工程；

D. 形質転換された該生殖細胞を用いて生物を再生する工程、を包含する、方法。

5 7. 前記生物は、真核生物を含む、請求項 5 6 に記載の方法。

15

5 8. 前記生物は、哺乳動物を含む、請求項 5 6 に記載の方法。

5 9. トランスジェニック生物を作製するための方法であって、

20 A. トランスポゾンにコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子であって、該核酸配列は、少なくとも 1 つの核酸分子がメチル化されている、単離された核酸分子を提供する工程；

B. 該核酸分子で、所望の生物の生殖細胞を形質転換する工程；ならびに

C. 形質転換された該生殖細胞を用いて生物を再生する工程、を包含する、方法。

25

6 0. 前記生物は、真核生物を含む、請求項 5 9 に記載の方法。

6 1. 前記生物は、哺乳動物を含む、請求項 5 9 に記載の方法。。

6 2. 前記生物は、げっ歯類を含む、請求項 5 9 に記載の方法。

5

6 3. トランスジェニック生物を作製するためのキットであって、

A. トランスポゾンにコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子であって、該核酸配列は、少なくとも 1 つの核酸分子がメチル化されている、単離された核酸分子；

10 B. トランスポザアーゼ、を包含する、キット。

6 4. さらに、前記核酸分子およびトランスポザアーゼの使用法を記載する説明書を含む、請求項 6 3 に記載のキット。

15 6 5. トランスポゾンにコードする核酸配列を有する、単離された核酸分子であって、該核酸配列は、少なくとも 1 つの核酸がメチル化されている、単離された核酸分子の、トランスジェニック生物の作製のための使用。

要 約 書

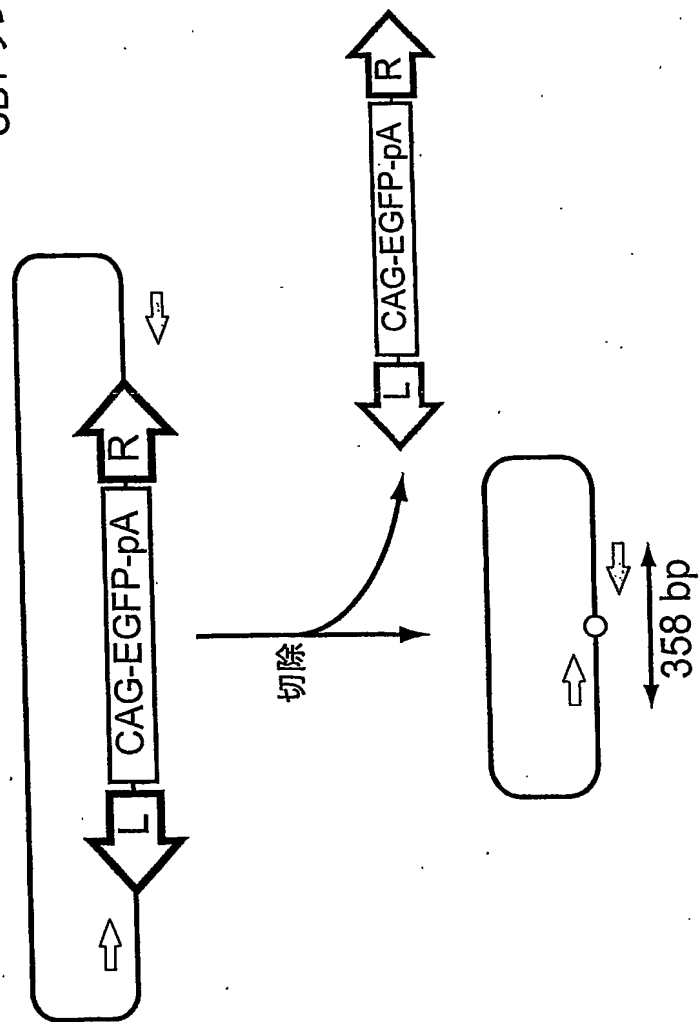
本発明は、トランスポゾンを用いて外来遺伝子を効率よく細胞に導入する技術に関する。より詳細には、本発明は、トランスポゾンを含む配列をメチル化

5 することによって、トランスポゾンの転位活性を飛躍的に向上させ、効率よくトランスジェニック生物を作製する技術に関する。メチル化は、ゲノムに組み込まれた後も保持されており、実際のゲノムへの遺伝子の組み込みにも利用することが可能になった。本発明を用いれば、従来のトランスポゾンを用いたトランスジェニック生物の作製方法よりも、格段に効率よく遺伝子を形質転換す

10 ることができる。

図1

a



b

トランスポゾン M N - NC
SBトランスポザゼ + + - -

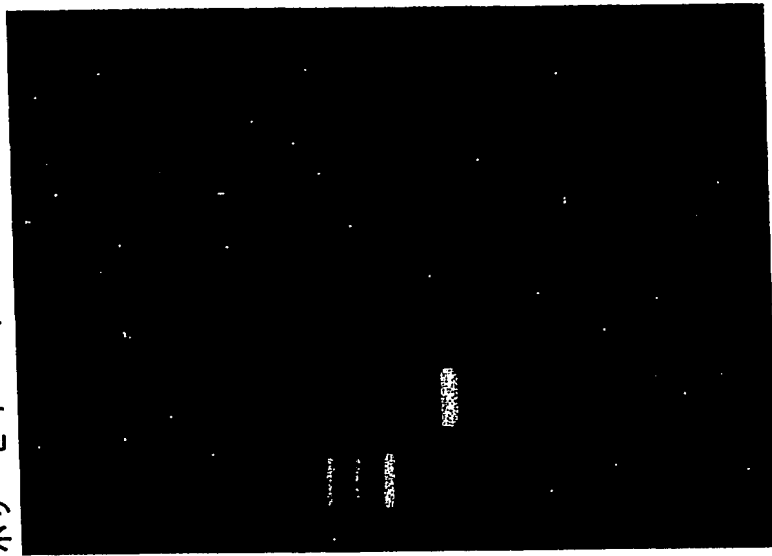


図2A

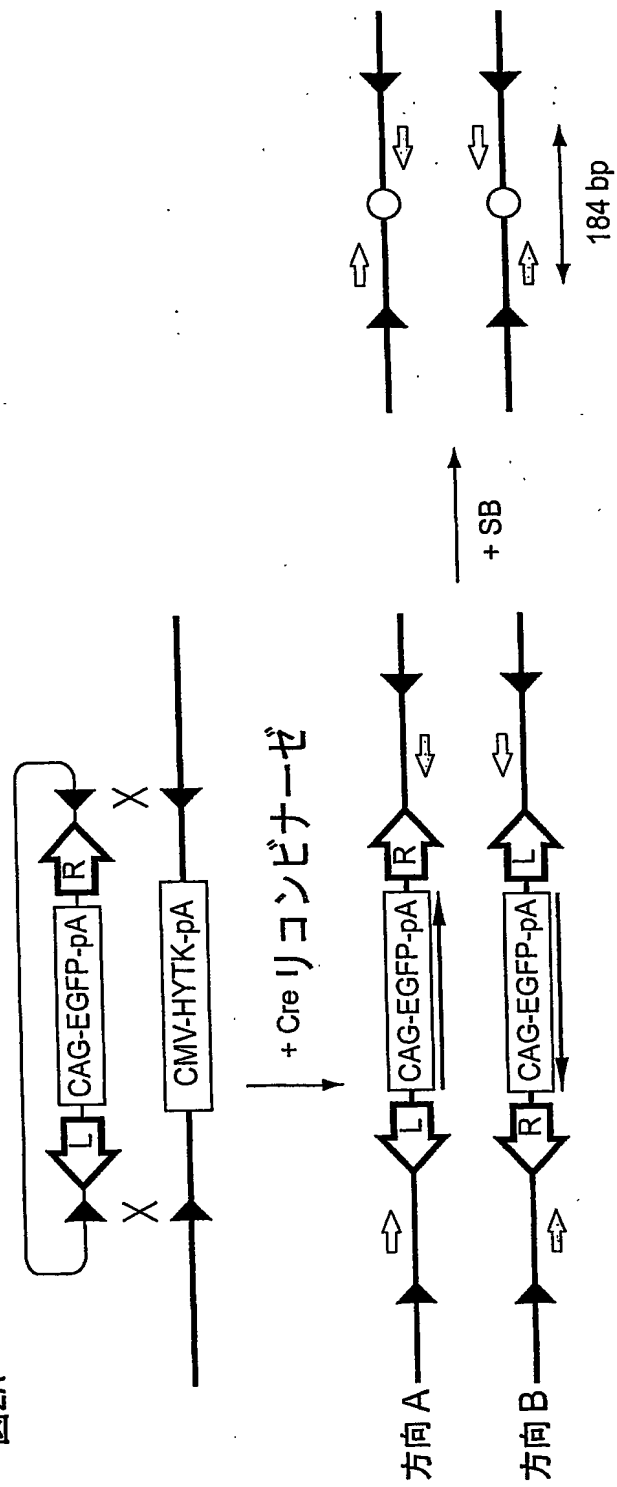
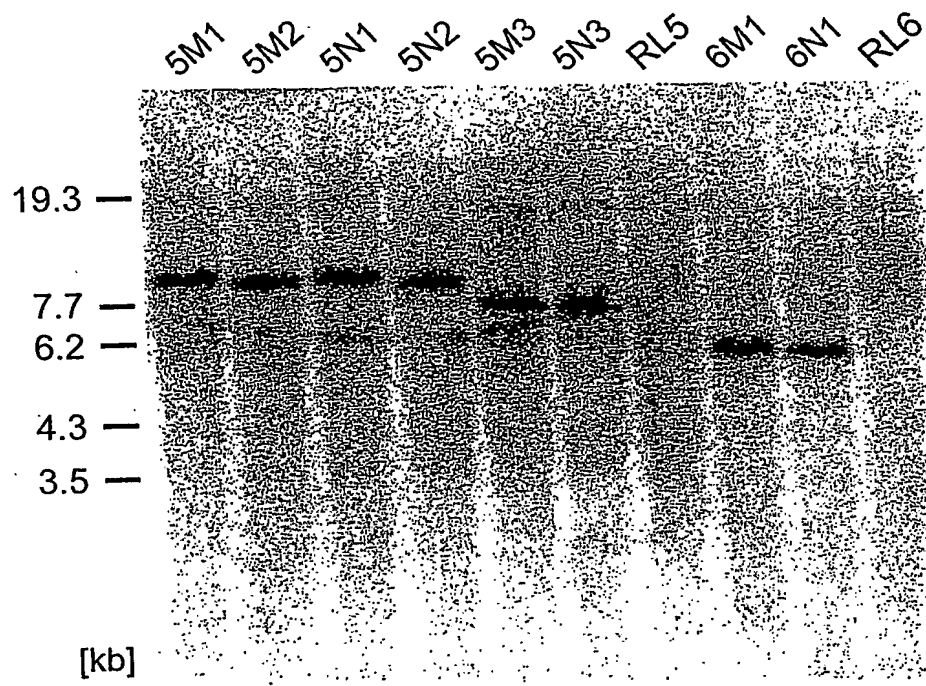
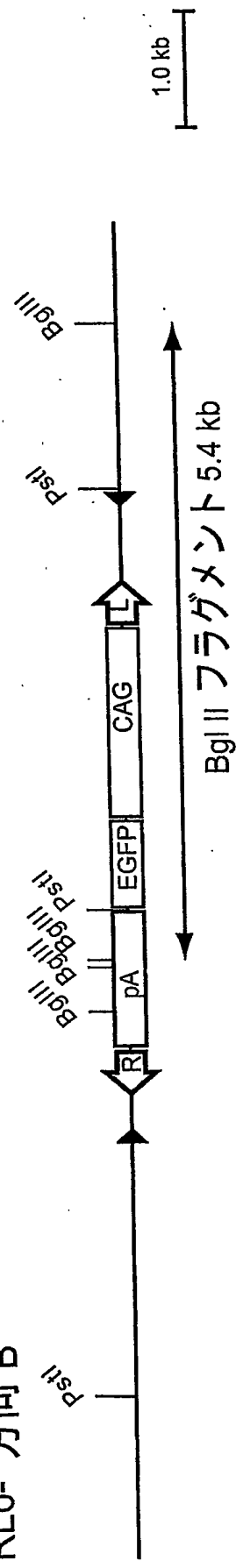
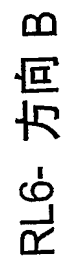
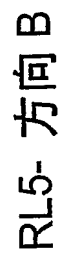


図2B



RL5- 方向 A



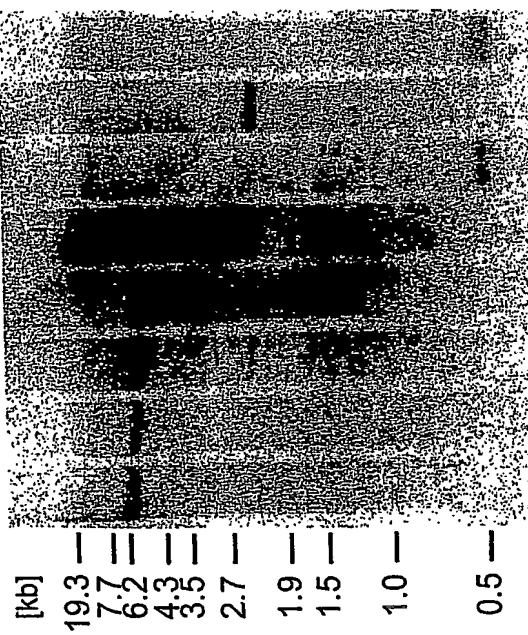
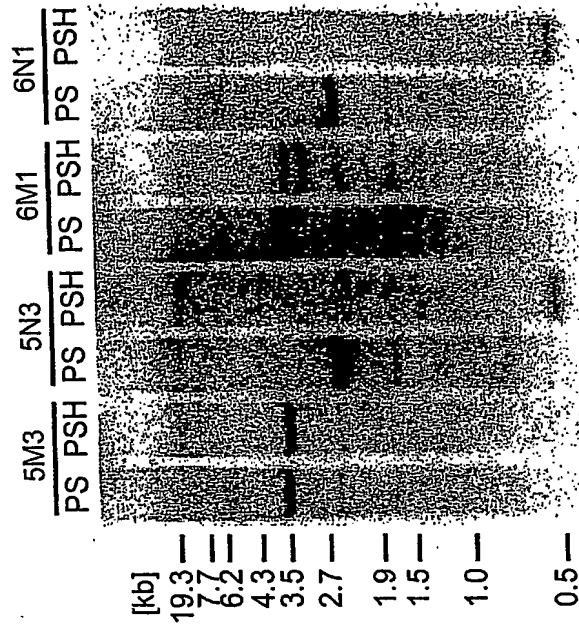
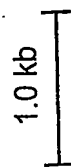


図3

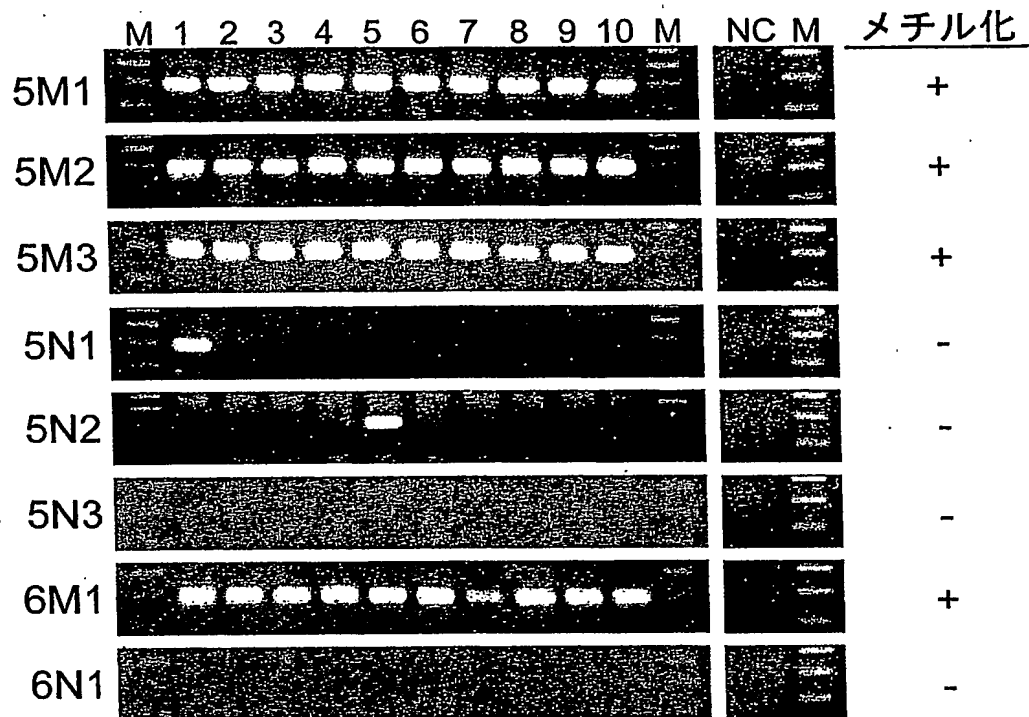
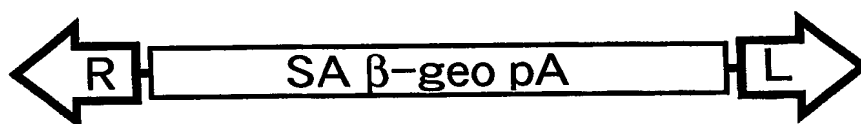
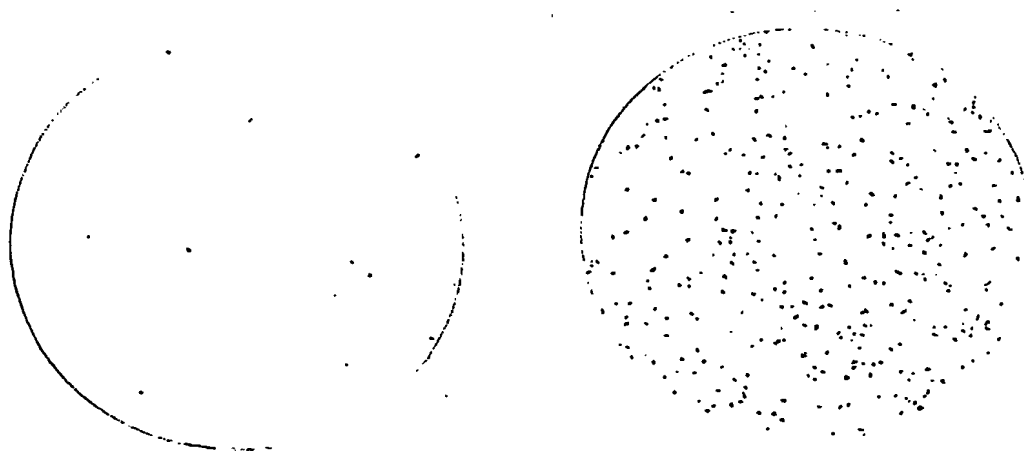


図4

a



b



非メチル化

メチル化

5A

CLUSTAL W (1.81) Multiple Sequence Alignments

Sequence type explicitly set to DNA

Sequence format is Pearson

Sequence 1: X01005 1610 bp

Sequence 2: Z29098 1773 bp

Sequence 3: Z29102 1717 bp

Sequence 4: U11641 1263 bp

Sequence 5: U11652 1296 bp

Sequence 6: L48685 1455 bp

Start of Pairwise alignments

Aligning...

Sequences (5:6) Aligned. Score: 3

Sequences (3:4) Aligned. Score: 3

Sequences (1:2) Aligned. Score: 9

Sequences (3:5) Aligned. Score: 3

Sequences (4:5) Aligned. Score: 95

Sequences (1:3) Aligned. Score: 9

Sequences (3:6) Aligned. Score: 10

Sequences (4:6) Aligned. Score: 3

Sequences (1:4) Aligned. Score: 1

Sequences (2:3) Aligned. Score: 99

Sequences (1:5) Aligned. Score: 3

Sequences (2:4) Aligned. Score: 3

Sequences (1:6) Aligned. Score: 2

Sequences (2:5) Aligned. Score: 3

Sequences (2:6) Aligned. Score: 10

Guide tree file created: [clustalw.dnd]

Start of Multiple Alignment

There are 5 groups

Aligning...

Group 1: Sequences: 2 Score:32613

Group 2: Delayed

Group 3: Delayed

Group 4: Sequences: 2 Score:22721

Group 5: Sequences: 4 Score:12095

Sequence:6 Score:13071

Sequence:1 Score:12960

Alignment Score 47622

CLUSTAL-Alignment file created [clustalw.ain]

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

Z29098

Z29102

U11641

U11652

L48685

X01005

CGAGCCCCAACCACTATTAATTGGAACAGCATGTTTTTTTTGCAGTGCGCAATGTTTAAC
TAAC

Z29098

Z29102

U11641

U11652

ACACTATATTATCAATACTACTAAAGATAACACATACCAATGCATTTTCGTCTCAAAGAGA
ACACTATATTATCAATACTACTAAAGATAACACATACCAATGCATTTTCGTCTCAAAGAGA

5B
L48685
X01005

CAGTTGAAGTC—GGAAG
CAGTGCTGGCCAAAAAGA

Z29098
Z29102
U11641
U11652
L48685
X01005

ATTTTATTCTCTTCACGACGAAAAAAAAGTTTTGCTCTATTTCCAACAACAACAAAAAT
ATTTTATTCTCTTCACGACGAAAAAAAAGTTTTGCTCTATTTCCAACAACAACAAAAAT

TTTACATACACTTAAGTTGGAGTCATTAAA—ACTCGTTTTTCAACTACACCACAAAT
TATCCA—CTTTTGGTTTTTTGTGTGTAA—CTTTTTTCTCAAGCATCCATTTGAC

Z29098
Z29102
U11641
U11652
L48685
X01005

ATGAGTAATTTATTCAAACGGTTTTGCTTAAGAGATAAGAAAAAGTGACCACTATTAATT
ATGAGTAATTTATTCAAACGGTTTTGCTTAAGAGATAAGAAAAAGTGACCACTATTAATT
AACATGT
ATTAGGT
TTC—TTGTTAA—CAAACAAT—AGTTTTGGCAAGTCAGTTAGGACATCTACTT
TTG—AATTTTTCCGTGTGCATAAAGCGAAATGTTACGCAAATTTGCGGACCAA—ACAT

* *

Z29098
Z29102
U11641
U11652
L48685
X01005

CGAAGCGGGCGTAAGCTTACCTTAATCTCAAGAAGAGCAAAACAAAAGCAACTAATGTAA
CGAAGCGGGCGTAAGCTTACCTTAATCTCAAGAAGAGCAAAACAAAAGCAACTAATGTAA
TGGCTG—ATAAGTCC—CCGGTTTGACAC—TAGTATTAATGCA—
TGGCTG—ATAAGTCC—CCGGTCTGACACATAGATGGCGTCTAGTATTAATGCA—
TGTGCATGACACAAGT—CATTTTTCCAACAATTGT—TTACAGACAGATTATTTCA
TACATGATTATCGATTTTTCTGAATTTTATTCAATTTT—TTGATTTTTCTGTTTTTCC

* * * *

Z29098
Z29102
U11641
U11652
L48685
X01005

CGGAATCATTATCTAGTTATGATCTGCAAATAAT—GTCACAATACAGCATGCAAAAA
CGGAATCATTATCTAGTTATGATCTGCAAATAAT—GTCACAATACAGCATGCAAAAA
TATTATTTTTATATAGGACCAACCTTCAAATGATTCGTGTCAAAATTTGACGTC—
TATTATTTTTATATAGTACCAACCTTCAAATGATTCGTGTCAAAATTTGACGTCGTGAAG
CTTATAATTCAGTGTATCACAATT—CCAGTGG—GTCAGAAGTTTACATACA—
AATTTTCATTATTTTTTTGAATTATCAATAAACGCACTCTGTTTGTGCACTGG—A

* * * * *

Z29098
Z29102
U11641
U11652
L48685
X01005

AATTTTAGATTGCTGCA—GATCAGTAGAAGTTTAGCAACGATGGTTCGTGGTAAACCTA
AATTTTAGATTGCTGCA—GATCAGTAGAAGTTTAGCAACGATGGTTCGTGGTAAACCTA
—AATTAGTTTGTGAGA—GCAACTTTTGTATTGTGAAGAAAA
TCAATTAGTTTGTGAGATAGAGCGTCTTTTGTGAAGCAACTTTTGTATTGTGAAGAAAA
—CTAAGTTGACTGTG—CCTTTAAA—CAGCTTGGAAAATTCAG—AAAATGA
TTTGTTTGGTTGATAAAT—TATTTTAAAGGTATGGTAAATCTGTTGGGTGTAAAAATC

* * * * *

Z29098
Z29102
U11641
U11652
L48685
X01005

TTTCTAAAG—AAATCAGAGTATTGATTAGGGATTATTTTAAATCTGGAAAG
TTTCTAAAG—AAATCAGAGTATTGATTAGGGATTATTTTAAATCTGGAAAG
TGGAAAAAATTTCAATTCGAATTTCTGTGTTTTGATAAAATACTGTTTTCTGAAGGGAAAA
TGGAAAAA—AGGAATTTCTGTGTTTTGATAAAATACTGTTTTCTGAAGGGAAAA
TGTGATGGC—TTTAGAAGCTTC—TGATAGACTAATTGACATCATTGAG
TTTCCTTGG—ACGTCAAGAAAGCCATTGTAG—CTGGCTTGAACAAGGAAT

* * * * *

Z29098
Z29102
U11641
U11652
L48685
X01005

ACACTTACGGAGATAAGCAAGCAATTAATTTGCCTAAGTCGTCTGTGCATGGGGTGAT—
ACACTTACGGAGATAAGCAAGCAATTAATTTGCCTAAGTCGTCTGTGCATGGGGTGAT—
AA—TGCGGTGG—AAGCAAAAAGTTGGCTTGATAATGAGTTTCCGGACTCTGCCCAA—
AA—TACAGTGG—AAGCAAAAAGTTGGCTTGATAATGAGTTTCCGGACTCTGCCCAA—
TCAATT—GGAGGTGTACCTGTGGATGTATT—CAAGGCCTACCTTCA—AACGCAGT—
ACCCACGAAAAGCTCGCGCTGCAAATTCACGTTCTCCGTGACTATTTGGAAAGTAATC

图5C

Z29098
Z29102
U11641
U11652
L48685
X01005

ACAAATTTTCAAAAAA-AATGGGAATATTGAAAATAA-CA-TTGCGAATAGAGGCCGAA
ACAAATTTTCAAAAAA-AATGGGAATATTGAAAATAA-CA-TTGCGAATAGAGGCCGAA
GGAAATCAATAATAATTGATTGGTATGCAAAATTCAGCG-AGGTGAAATGAGCACGGA
GGAAATCAACAATAATTGATTGGTATGCAAAATTCAGCG-TGGTGAATGAGCACGGA
GCCTCTTTGCTTGACATAATGGGAAAATCAAAAGAAATCAGCCAACACCATGGGACCACG
AAGAAGTACCAAACCTGAGGTGAGTTCGAAAAATATTATTTTTTAATAATAATGTTTAGA

* * * * *

Z29098
Z29102
U11641
U11652
L48685
X01005

CATCAGCAA-TAACACCCCGCGACAAAAGACAA-CTGGCCAAAATTGTTAAGGCTGAT
CATCAGCAA-TAACACCCCGCGACAAAAGACAA-CTGGCCAAAATTGTTAAGGCTGAT
GGACGGTGA-ACGCAGTGGACGCCCCGAAAG-AG-GTGGTTACCGACGAAAA-
GGACGGTGA-ACGCAGTGGACGCCCCGAAAG-AG-GTGGTTACCGACGAAAA-
CAGCGTCA-TACCGCTCAGGAATGAGACGCATTCTGTCTCCTAGAGATAAA-
AATCCGTGCTTTGAGAATCTCGCCCGCGAGGCT-CGAGTGACAACCCATAGGATGGAT

* * * * *

Z29098
Z29102
U11641
U11652
L48685
X01005

CGTCGCCAATCTTTGAGAAATTTGGCTTCTAAGTGGTCGCA-GCAATTGGCAAAACT
CGTCGCCAATCTTTGAGAAATTTGGCTTCTAAGTGGTCGCA-GCAATTGGCAAAACT
CATCAAAAAATCCACAAAAT-GATTTTGAATGACCGTAAAATGAAGTTGATCGAGAT
CATCAAAAAATCCACAAAAT-GATTTTGAATGACCGTAAAATGAAGTTGATCGAGAT
CAT-ACTGTGGTGGCAAAAGT-GCAAATCAATCCGAGAACGACAGCAAGGACCT
CGC-AACATCCTCCGATCAGCA-AGAGAAGATCCGCATAG-GACCGCCACGGATAT

* * * * *

Z29098
Z29102
U11641
U11652
L48685
X01005

GTCAAGCGAGAGTGGACGCGACAAATTAATAAGTAT-TGGATATGGTTTTTATAAAGT
GTCAAGCGAGAGTGGACGCGACAAATTAATAAGTAT-TGGATATGGTTTTTATAAAGT
AACAAA-GGCCTTAACATATCAAA-GGAACGTGT-TGGTCATATCATTATCAA-
AGCAGA-GGCCTTAAGATATCAAA-GGAACGTGT-TGGTCATATCATTATCAA-
TGTGAA-GATGCTGGAGAAAACAGGTATGAATGTTTCTATATCCACAGTAAAAACGAGTC
-TCAATGATTATAAGTTCTCCAATGAACCTGTAC-CAAGTAAACGAAGTGTTCGTG

* * * * *

Z29098
Z29102
U11641
U11652
L48685
X01005

ATGTTTTGTTATTACCTGTGCATCGTACCCAATAACTTACTCGTAATCTTACTCGTAGGC
ATGTTTTGTTATTACCTGTGCATCGTACCCAATAACTTACTCGTAATCTTACTCGTAGGC
-TATTTGGATAT-GCGGAAGCTCTGTGCAAAATGGGTGCCGCGCGAAGTCAAT-TTGAC
-TATTTGGATAT-GCGGAAGCTCTGTGCAAAATGGGTGCCGCGCGAAGTCAAT-TTGAC
CTATATCGACATAACCTGAAAGGC-CGCTCAGCAAGGAAGAAGCCA-CTGCTCCAAAAC
GACGTTTACAGCAAGCAGGACTACACGGACGA-AAGCCAGTCAAGAAACGTTTATCAGT

* * * * *

Z29098
Z29102
U11641
U11652
L48685
X01005

CAAGG-AAAAACCCCTTGCTTACGCTTCGTCAAAAAAGAAGCGTTTGCAATGGG-CTCG
CAAGG-AAAAACCCCTTGCTTACGCTTCGTCAAAAAAGAAGCGTTTGCAATGGG-CTCG
CAAAA-ACAACAACGTGTTGATGATTCT-GAGCGGTGTTTGACGCTGT-TAAC
CAAAA-ACAACAACGTGTTGATGATTCT-GAGCGGTGTTTGACGCTGT-TAAC
CGCCATAAAAAAGCCAGACTACGGTTTGCAACTGCACATGGGGACAAATATGGTACTTTT
AAGAA-AAATCGCATGGCTCGAGTTGCGTGGGCAAAAGC-GCATCTTCGTTGGGGACGTC

* * * * *

Z29098
Z29102
U11641
U11652
L48685
X01005

GGAAAGGATGTCTTGGACTCAAAGGCAATGGGATACCATCATATTGAGCATGAAGCTAA
GGAAAGGATGTCTTGGACTCAAAGGCAATGGGATACCATCATATTGAGCATGAAGCTAA
TCGTAATACACCCGAGTTTTTCCGTGATATG-TAACAATGGATGAAACATGGCTCCATC
TCGTAATACACCCGAGTTTTTCCGTGATATG-TGACAATGGATGAAACATGGCTCCATC
TGGAGAAATGTCTCTCTTCTGGTCTGATGAA-AAAAAATAAGAACTATTTGGCCAT
AGGAATGGGCTAAACACATCTGGTCTGACGAA-AGCAAGTTCAATTTGTTGGGAGAT

* * * * *

5D

Z29098
Z29102
U11641
U11652
L48685
X01005

ATTTGATGTTAGTGTGGCGATACGAGAAAACGCGTCATCCGTAAAGAGGTGAGAAACATA
ATTTGATGTTAGTGTGGCGATACGAGAAAACGCGTCATCCGTAAAGAGGTGAGAAACATA
ACTACACTCCTGAGTTCGATCAACAGTCGGCTGAGTGGACAGCGACCGGT—GAACCGTC
ACTACACTCCTGAGTCCAAACGACAGTCGGCTGAGTGGACAGCGACCGGT—GAACCGTC
AATGACCATCGTTAT—GTTTGGAGGAAAAAGGGGAGCTTGCAAGCCG—AAGATCA
GATGGAAATTCCTG—GGTACGTCGTCCTGTTGGCTCTAGGTACTCTCCAAAGTA

* * *

Z29098
Z29102
U11641
U11652
L48685
X01005

CCATAAAGACTGCCTTAAAAGAACAACAAAGTTTCCTGCGAGCACTATGGTATGGGGATG
CCATAAAGACTGCCTTAAAAGAACAACAAAGTTTCCTGCGAGCACTATGGTATGGGGATG
TCCGAAG—CGTGGAAAGACTCAAAAGTCCGCTGGCAAAGTAATGGCCTCTGTTTT
TCCGAAG—CGTGGAAAGACTCAAAAGTCCGCTGGCAAAGTAATGGCCTCTGTTTT
CCATC—CCAAGCGTGAAGCACGGGGG—TGGCAGCATCATGTTGTGGGGGTG
TCAATGC—CCAACCGTTAAGCATGGAGG—TGGGAGCGTCATGGTGTGGGGGTG

* * * * *

Z29098
Z29102
U11641
U11652
L48685
X01005

TATGTCTGCCAAAGGATTAGGAAAACCTTCATTTTCATTGAAGGGACAGTTAATGCTGAAAA
TATGTCTGCCAAAGGATTAGGAAAACCTTCATTTTCATTGAAGGGACAGTTAATGCTGAAAA
TTGGAATGCGCATGGAATAATTTTTATCGATTATCTTGAGAAGGAAAAAACCATCAACAG
TTTCGATGCGCATGGAATAATTTTTATCGATTATCTTGAGAAGGAAAAAACCATCAACAG
CTTTGCTGCAAGGAGGAGTGGTGCACCTTCACAAAATAGATGGCATCATGACAAAGGAAAA
CTTCACCAGCACTTCATGGGCCCACTAAGGAGAATCCAAAGCATTATGGATCGTTTTCA

* * *

Z29098
Z29102
U11641
U11652
L48685
X01005

ATATATTAATATTTTACAAGATAGTTTGTGGCCATCAATACCAAAACTATTAGATTGCGG
ATATATTAATATTTTACAAGATAGTTTGTGGCCATCAATACCAAAACTATCAGATTGCGG
—TGACTATTATATGGCGTTATTGTAGCGTTTGAAGGTGCAAAATCGCGGCAAAATGG
—TGACTATTATATGGCGTTATTGGAGCGTTTGAAGGTGCAAAATCGCGGCAAAACGG
TTATGTGGCTATATTGAAGCAACATCTCAAGACATCAGTCAGGAAGTTCAAGCTTGGTCA
ATACGAAAACATCTTTGAAACTACAATGCGACCGTGGGCACTTCAAAATGTGGGCCGTGG

** * * *

Z29098
Z29102
U11641
U11652
L48685
X01005

TGAATTCACTTTTAGCAGGAGCGGAGCATCATCGCAC—ACAGCCAAGCGAACCACAAA
TGAATTCACTTTTAGCAGGAGCGGAGCATCATCGCAC—ACAGCCAAGCGAACCACAAA
—CCCCATATGAAGAAGAAAAAGTGTGTTCCACCAAGACAATGCACCGTGCCACAA
—CCCCATATGAAGAAGAAAAAGTGTGTTCCACCAAGACAACGCACCGTGCCACAA
CAAATGGGTCTTCCAAATGGACAATGACCTCAAGCAT—ACTTCCAAAGTTGTGGCAA
C—TTCGTGTTTACGAGGATAACGATCCTAAGCAT—ACTTCTCTTCATGTGCGTT

* * * * *

Z29098
Z29102
U11641
U11652
L48685
X01005

ATTGGCTGCAATATAATCAAATGGAGGTTTTAGATTGGCCATCAAATAGTCCAGATCTAA
ATTGGCTGCAATATAATCAAATGGAGGTTTTAGATTGGCCATCAAATAGTCCAGATCTAA
GTCAGTAAGAACGATGGCAAA—AATTCATGAATTGGGCTTGAATTGCTTCCCACCC
GTCATTGAGAACGATGGCAAA—AATTCATGAATTGGGCTTGAATTGCTTCCCACCC
AATGGCTTAAGGTCAACAAAGTCAAGGTATTGGAGTGGCCATCACAAGCTCTGACCTCA
CATGTTTTCAACGTCGTCATGTGCATTTGCTCGATTGGCCAAGTCAGTCTCGGACTTGA

* * * * *

Z29098
Z29102
U11641
U11652
L48685
X01005

GCCCAATTGAAAATATTTGGTGGCTAATGAAAAACCGACTT—CGAAAT—GAGCC—ACA
GCCCAATTGAAAATATTTGGTGGCTAATGAAAAACCGACTT—CGAAAT—GAGCC—ACA
ACTATATTCTCCAGATCTGGCCCCAGCGAATTTTCTTGT—TCTCA—GACCT—CAA
ACCGTATTCTCCAGATCTGGCCCCAGCGACTTTTTCTTGT—TCTCA—GACCT—CAA
ATCCTATAGAAAGGAGGAATGAGCCAAAATTCACCCAACTTATTGTGG—AAGCTTGTG
ATCCAATAGAGCATTGTGGGAAGAGTTGGAAAGACGCTTGGAGGTATTCGGCT—TCA

** * *

Z29098
Z29102

AAGGAATATTTCTGACTTGAAAATCAAGTTGCAAGAGATGTGGGACTCAATTTCTCAAGA
AAGGAATATTTCTGACTTGAAAATCAAGTTGCAAGAGATGTGGGACTCAATTTCTCAAGA

图5E

U11641 AAGGGATGCTCGCAGGGAAAAAATTTGGCTGCAATGAA— GAGG
 U11652 AAGG-ATGCTCGCAGGGAAAAAATTTGGCTGCAATGAA— GAGG
 L48685 GAAGGCTACTCGAAATGTTTGACCCAAGTTAAACAATTT— AAAG
 X01005 AATGCAGATGCCAAATTC—AACCAGTTGGAAAACGCTTGGAAAGCTATCCCCATGTCA
 * * * *

Z29098 GCATTGCAAAAATTTGTTAAGCTCAATGCCAAAACGAGTTAAATGCGTAATGCAGGCCAA
 Z29102 GCATTGCAAAAATTTGTTAAGCTCAATGCCAAAACGAGTTAAATGCGTAATGCAGGCCAA
 U11641 TAATCGCCGAAAC—TAAGGCCTATTTTGAGGCAAAAACCGTAAGAGTACTA—CCA
 U11652 TGATCGCCGAAAC—TGAGGCCTATTTTGAGGCAAAAACCGAAGGAGTACTA—CCA
 L48685 GCAATGCTA—CCAAATACTAATTGAGTGTATGTTAACTTC-TGACCCA—CTGG
 X01005 GTTATTCACAAGCTGATCGA-CTCGATGCCACGTCGTTGTCAAGCTGTTATTGATGCAAA
 * * *

Z29098 GGGCGACGTTACACAATTCTAATATTAATTAATTTATTGTTTTAAGTATGATAGTAAATC
 Z29102 GGGCGACGTTACACAATTCTAATATTAATTAATTTATTGTTTTAAGTATGATAGTAAATC
 U11641 AAATGGTATCAAAAAATTGGAAGGTCGTTATAATCGTGGTATCGCTGTTGA-AGGGGACT
 U11652 AAATGGTATCAAAAAATTGGAAGGTCGTTATAATCGTGGTATCGCTGTTGA-AGGGGACT
 L48685 GAATGTGATGAAAGAAATAAAGCTGAAATGAATCATTCTCTCTACTATTATTCTG—
 X01005 CGGATACGCGACAAAGTATTAAGCATAATTATGTTGT-TTTTAAATCCAATTGC—TC
 * * * ** * * * *

Z29098 ACATTACGCCGCGTTTGAATTAATAGTGGTCACTTTTTTCTTATCTCTTAAGCAAACCGT
 Z29102 ACATTACGCCGCGTTTGAATTAATAGTGGTCACTTTTTTCTTATCTCTTAAGCAAACCGT
 U11641 ATGTTGAATAATAA—AAACGAATTTTGACAAAAA—TGTGTTTTCTTTGTTAGACCGG
 U11652 ATGTTGAATAATAA—AAACGAATTTTGACAAAAAATGTGTTTTCTTTGTTAGACCGG
 L48685 ATATTTACATTCTTAAATAA—GTGGTGA—TCCTAACTGACCTTAAGACAGGGAAT
 X01005 ATATTCGGTACTT—TAATTGTCATTTCTTGCAACCTCGGTTTTTTCAATATTT
 * ** ** *

Z29098 TTGAATAAATTACTCATATTTTTGTTGTTGTTGGAAATAGAGCAAAACTTTTTTTTTCTG
 Z29102 TTGAATAAATTACTCATATTTTTGTTGTTGTTGGAAATAGAGCAAAACTTTTTTTTTCTG
 U11641 —GGACTTATCACCCAACCTGTTA—
 U11652 —GGACTTATCAGCCAACCTGTTA—
 L48685 C—TTTACTCGGATTAATGTGAGCAATTTGTGAAAAAGTGAGTTTAAATGTATTG—GC
 X01005 C—TAGTTTTTCGATTTTTTTGAATTTTTCTGAAGTTTTTCAAAATCTGTTGAACAT
 *

Z29098 CGTGAAGAGAATAAAATTCTCTTTGAGACGAAATGCATTGGTATGTGTTATCTTTAGTAG
 Z29102 CGTGAAGAGAATAAAATTCTCTTTGAGACGAAATGCATTGGTATGTGTTATCTTTAGTAG
 U11641 —————
 U11652 —————
 L48685 TAAGGTGTATGTAACTTCCGACTTCAACTG—
 X01005 TTTTG—ATGAATATTGTGTTTTTAGATTTTGTGAACACTGTGGTGAAGTTTCAAAACA

Z29098 TATTGATAATATAGTGTGTTAAACATTGCGCACTGCAAAAAAACATGCTGTTTGAATTA
 Z29102 TATTGATAATATAGTGTGTTAAACATTGCGCACTGCAAAAAAACATGCTGTTTGAATTA
 U11641 —————
 U11652 —————
 L48685 —————
 X01005 AAATAACCACTTAGAAAAAGTTACACACAAAAAACCAAAAGTGGATATCTTTTTGGCCA

Z29098 ATAGTGGTTGGGGCTCG
 Z29102 ATAGTGGTTGGGGCTCG
 U11641 —————
 U11652 —————

5F

L48685
X01005

GCACTG_____

(
(
X01005:0.47463,
(
U11641:0.02397,
U11652:0.01879)
:0.47911)
:0.01531,
(
Z29098:0.00029,
Z29102:0.00029)
:0.42978,
L48685:0.46683):

SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

<120> Method and System for producing transgenic organisms

<130> KJ004PCT

<160> 14

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1455

<212> DNA

<213> Tanichthys albonubes

<300>

<308> L48685

<309> 1996-05-31

<313> (1).. (1455)

<220>

<221> misc_feature

<222> (1).. (1455)

<223> /note="Tc1-like transposon"/SB transposon

<400> 1

cagttgaagt cggaagttta catacactta agttggagtc attaaaactc gtttttcaac 60

tacaccacaa atttcttggtt aacaaacaat agttttggca agtcagtttag gacatctact 120

ttgtgcatga cacaagtcac ttttccaaca attgtttaca gacagattat ttcaattata 180

attcactgta tcacaattcc agtgggtcag aagttttacat acactaagtt gactgtgcct 240

ttaaacagct tggaaaattc cagaaaatga tgtcatggct ttagaagctt ctgatagact	300
aattgacatc atttgagtca attggagggtg tacctgtgga tgtatttcaa ggcctacctt	360
caaacgcagt gcctctttgc ttgacataat gggaaaatca aaagaaatca gccaacacca	420
tgggaccacg cagccgtcat accgctcagg aatgagacgc attctgtctc ctagagataa	480
acatactgtg gtgcgaaaag tgcaaatcaa tcccagaacg acagcaaagg accttgtaa	540
gatgctggag aaaacaggta tgaatgtttc tatatccaca gtaaaaacga gtcctatc	600
gacataacct gaaaggccgc tcagcaagga agaagccact gtccaaaaac cgccataaaa	660
aagccagact acggtttgca actgcacatg gggacaaata tggctactttt tggagaaatg	720
tcctctcttc tggctctgatg aaaaaaaaaat agaactatctt ggccataatg accatcgta	780
tgtttggagg aaaaaggggg agcttgcaag ccgaagatca ccatccaag cgtgaagcac	840
gggggtggca gcatcatgtt gtgggggtgc ttgctgcag gagggactgg tgcacttcac	900
aaaatagatg gcatcatgac aaaggaaaat tatgtggcta tattgaagca acatctcaag	960
acatcagtca ggaagttcaa gcttgggtcac aaatgggtct tccaaatgga caatgacctc	1020
aagcatactt ccaaagttgt ggcaaaatgg ctttaaggta acaaagtcaa ggtattggag	1080
tggccatcac aaagctctga cctcaatcct atagaaagga ggaatgagcc aaaattcacc	1140
caacttattg tgggaagctt gtggaaggct actcgaaatg ttgacccaa gttaaacaat	1200
ttaaaggcaa tgctacaaa tactaattga gtgtatgtta acttctgacc cactgggaat	1260
gtgatgaaag aaataaaagc tgaaatgaat cattctctct actattatto tgatatttca	1320

cattcttaaa ataaagtggt gatcctaact gaccttaaga cagggaatct ttactcggat 1380

taaatgtcag gaattgtgaa aaagtgagtt taaatgtatt tggctaaggt gtatgtaaac 1440

ttccgacttc aactg 1455

<210> 2

<211> 1023

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sleeping Beauty transposase

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1023)

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1023)

<223> Sleeping Beauty transposase

<400> 2

atg gga aaa tca aaa gaa atc agc caa gac ctc aga aaa aaa att gta 48

Met Gly Lys Ser Lys Glu Ile Ser Gln Asp Leu Arg Lys Lys Ile Val

1 5 10 15

gac ctc cac aag tct ggt tca tcc ttg gga gca att tcc aaa cgc ctg 96

Asp Leu His Lys Ser Gly Ser Ser Leu Gly Ala Ile Ser Lys Arg Leu

20 25 30

aaa gta cca cgt tca tct gta caa aca ata gta cgc aag tat aaa cac 144

Lys Val Pro Arg Ser Ser Val Gln Thr Ile Val Arg Lys Tyr Lys His
 35 40 45

cat ggg acc acg cag ccg tca tac cgc tca gga agg aga cgc gtt ctg 192
 His Gly Thr Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Ser Gly Arg Arg Arg Val Leu
 50 55 60

tct cct aga gat gaa cgt act ttg gtg cga aaa gtg caa atc aat ccc 240
 Ser Pro Arg Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Lys Val Gln Ile Asn Pro
 65 70 75 80

aga aca aca gca aag gac ctt gtg aag atg ctg gag gaa aca ggt aca 288
 Arg Thr Thr Ala Lys Asp Leu Val Lys Met Leu Glu Glu Thr Gly Thr
 85 90 95

aaa gta tct ata tcc aca gta aaa cga gtc cta tat cga cat aac ctg 336
 Lys Val Ser Ile Ser Thr Val Lys Arg Val Leu Tyr Arg His Asn Leu
 100 105 110

aaa ggc cgc tca gca agg aag aag cca ctg ctc caa aac cga cat aag 384
 Lys Gly Arg Ser Ala Arg Lys Lys Pro Leu Leu Gln Asn Arg His Lys
 115 120 125

aaa gcc aga cta cgg ttt gca act gca cat ggg gac aaa gat cgt act 432
 Lys Ala Arg Leu Arg Phe Ala Thr Ala His Gly Asp Lys Asp Arg Thr
 130 135 140

ttt tgg aga aat gtc ctc tgg tot gat gaa aca aaa ata gaa ctg ttt 480
 Phe Trp Arg Asn Val Leu Trp Ser Asp Glu Thr Lys Ile Glu Leu Phe
 145 150 155 160

ggc cat aat gac cat cgt tat gtt tgg agg aag aag ggg gag gct tgc 528
 Gly His Asn Asp His Arg Tyr Val Trp Arg Lys Lys Gly Glu Ala Cys
 165 170 175

aag ccg aag aac acc atc cca acc gtg aag cac ggg ggt ggc agc atc 576

Lys Pro Lys Asn Thr Ile Pro Thr Val Lys His Gly Gly Gly Ser Ile
180 185 190

atg ttg tgg ggg tgc ttt gct gca gga ggg act ggt gca ctt cac aaa 624
Met Leu Trp Gly Cys Phe Ala Ala Gly Gly Thr Gly Ala Leu His Lys
195 200 205

ata gat ggc atc atg agg aag gaa aat tat gtg gat ata ttg aag caa 672
Ile Asp Gly Ile Met Arg Lys Glu Asn Tyr Val Asp Ile Leu Lys Gln
210 215 220

cat ctc aag aca tca gtc agg aag tta aag ctt ggt cgc aaa tgg gtc 720
His Leu Lys Thr Ser Val Arg Lys Leu Lys Leu Gly Arg Lys Trp Val
225 230 235 240

ttc caa atg gac aat gac ccc aag cat act tcc aaa gtt gtg gca aaa 768
Phe Gln Met Asp Asn Asp Pro Lys His Thr Ser Lys Val Val Ala Lys
245 250 255

tgg ctt aag gac aac aaa gtc aag gta ttg gag tgg cca tca caa agc 816
Trp Leu Lys Asp Asn Lys Val Lys Val Leu Glu Trp Pro Ser Gln Ser
260 265 270

cct gac ctc aat cct ata gaa aat ttg tgg gca gaa ctg aaa aag cgt 864
Pro Asp Leu Asn Pro Ile Glu Asn Leu Trp Ala Glu Leu Lys Lys Arg
275 280 285

gtg cga gca agg agg cct aca aac ctg act cag tta cac cag ctc tgt 912
Val Arg Ala Arg Arg Pro Thr Asn Leu Thr Gln Leu His Gln Leu Cys
290 295 300

cag gag gaa tgg gcc aaa att cac cca act tat tgt ggg aag ctt gtg 960
Gln Glu Glu Trp Ala Lys Ile His Pro Thr Tyr Cys Gly Lys Leu Val
305 310 315 320

gaa ggc tac ccg aaa cgt ttg acc caa gtt aaa caa ttt aaa ggc aat 1008

Glu Gly Tyr Pro Lys Arg Leu Thr Gln Val Lys Gln Phe Lys Gly Asn
 325 330 335

gct acc aaa tac tag
 Ala Thr Lys Tyr
 340

1023

<210> 3
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Sleeping Beauty transposase

<400> 3

Met Gly Lys Ser Lys Glu Ile Ser Gln Asp Leu Arg Lys Lys Ile Val
 1 5 10 15

Asp Leu His Lys Ser Gly Ser Ser Leu Gly Ala Ile Ser Lys Arg Leu
 20 25 30

Lys Val Pro Arg Ser Ser Val Gln Thr Ile Val Arg Lys Tyr Lys His
 35 40 45

His Gly Thr Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Ser Gly Arg Arg Arg Val Leu
 50 55 60

Ser Pro Arg Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Lys Val Gln Ile Asn Pro
 65 70 75 80

Arg Thr Thr Ala Lys Asp Leu Val Lys Met Leu Glu Glu Thr Gly Thr
85 90 95

Lys Val Ser Ile Ser Thr Val Lys Arg Val Leu Tyr Arg His Asn Leu
100 105 110

Lys Gly Arg Ser Ala Arg Lys Lys Pro Leu Leu Gln Asn Arg His Lys
115 120 125

Lys Ala Arg Leu Arg Phe Ala Thr Ala His Gly Asp Lys Asp Arg Thr
130 135 140

Phe Trp Arg Asn Val Leu Trp Ser Asp Glu Thr Lys Ile Glu Leu Phe
145 150 155 160

Gly His Asn Asp His Arg Tyr Val Trp Arg Lys Lys Gly Glu Ala Cys
165 170 175

Lys Pro Lys Asn Thr Ile Pro Thr Val Lys His Gly Gly Gly Ser Ile
180 185 190

Met Leu Trp Gly Cys Phe Ala Ala Gly Gly Thr Gly Ala Leu His Lys
195 200 205

Ile Asp Gly Ile Met Arg Lys Glu Asn Tyr Val Asp Ile Leu Lys Gln
210 215 220

His Leu Lys Thr Ser Val Arg Lys Leu Lys Leu Gly Arg Lys Trp Val
225 230 235 240

Phe Gln Met Asp Asn Asp Pro Lys His Thr Ser Lys Val Val Ala Lys
245 250 255

Trp Leu Lys Asp Asn Lys Val Lys Val Leu Glu Trp Pro Ser Gln Ser
260 265 270

Pro Asp Leu Asn Pro Ile Glu Asn Leu Trp Ala Glu Leu Lys Lys Arg
275 280 285

Val Arg Ala Arg Arg Pro Thr Asn Leu Thr Gln Leu His Gln Leu Cys
290 295 300

Gln Glu Glu Trp Ala Lys Ile His Pro Thr Tyr Cys Gly Lys Leu Val
305 310 315 320

Glu Gly Tyr Pro Lys Arg Leu Thr Gln Val Lys Gln Phe Lys Gly Asn
325 330 335

Ala Thr Lys Tyr
340

<210> 4
<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Left outside sequence

<400> 4

gttgaagtcg gaagtttaca cttagg

26

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Left inside sequence

<400> 5

ccagtgggtc agaagtttac atacactaag

30

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence;

<220>

<223> TgTP-1U

<400> 6

gaccgcttcc tcgtgcttta cggatc

27

<210> 7

<211> 30



<212> DNA

<213> Artificial Sequence;

<220>

<223> TgTP-2L

<400> 7

acacaggaaa cagctatgac catgattacg

30

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence;

<220>

<223> TgTP-2U

<400> 8

tctatcgctt tcttgacgag ttctttctgag

30

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence;

<220>

<223> TgTP-3L

<400> 9

caagcgcgca attaacccctc actaaagg

28

<210> 10

<211> 1610

<212> DNA
<213> Caenorhabditis elegans

<300>
<308> X01005
<309> 2002-07-07
<313> (1).. (1610)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1).. (1610)
<223> Transposon="Tc1"

<400> 10
cagtgtggc caaaaagata tccacttttg gttttttgtg tgtaactttt ttctcaagca 60
tccatttgac ttgaattttt ccgtgtgcat aaagcgaaat gttacgcaaa ttgcgggacc 120
aaacattaca tgattatcga ttttttctga attttatttc aattttttga ttttttcgtt 180
tttccaattt tcattatttt ttttgaatta tcaataaaac gcactctgtt tgttgcactg 240
gatttgtttg gttgataaat tattttttaag gtatggtaaa atctgttggg tgtaaaaatc 300
tttccttggc cgtcaagaaa gccattgtag ctggcttcga acaaggaata cccacgaaaa 360
gctcgcgctg caaattcaac gtcttcogtc gactatttgg aaagtaatca agaagtacca 420
aactgagggtg agttcgaaaa atattatttt ttaataataa atgttttagaa atccgtcgct 480
ttgagaatct cgcccggcag gcctcgagtg acaaccata ggatggatcg caacatcctc 540
cgatcagcaa gagaagatcc gcataggacc gccacggata ttcaaatgat tataagttct 600
ccaaatgaac ctgtaccaag taaacgaact gttcgtcgac gtttacagca agcaggacta 660

cacggacgaa agccagtcaa gaaaccgttc atcagtaaga aaaatcgcat ggctcgagtt 720
 gcgtgggcaa aagcgcatct tcgttgggga cgtcaggaat gggctaaaca catctggtct 780
 gacgaaagca agttcaattt gttcgggagt gatggaaatt cctgggtacg tcgtcctgtt 840
 ggctctaggt actctccaaa gtatcaatgc ccaaccgtta agcatggagg tgggagcgtc 900
 atggtgtggg ggtgcttcac cagcacttcc atgggccac taaggagaat ccaaagcatt 960
 atggatcgtt ttcaatacga aaacatcttt gaaactacaa tgcgaccctg ggcacttcaa 1020
 aatgtgggcc gtggcttcgt gtttcagcag gataacgac ctaagcatac ttctcttcat 1080
 gtgcgttcat ggtttcaacg tcgtcatgtg catttgctcg attggccaag tcagtctccg 1140
 gacttgaatc caatagagca tttgtgggaa gagttggaaa gacgtcttgg aggtattcgg 1200
 gcttcaaattg cagatgccaa attcaaccag ttggaaaacg cttggaaagc tatcccatg 1260
 tcagttattc acaagctgat cgactcgatg ccacgtcgtt gtcaagctgt tattgatgca 1320
 aacggatacg cgacaaagta ttaagcataa ttatgttggt tttaaatcca attgctcata 1380
 ttccgttact ttaattgtca tttccttgca acctcggttt tttcaatatt tctagttttt 1440
 cgattttttt gaatttttct gaagtttttt caaaatctgt tgaacatttt tgatgaatat 1500
 tgtgttttta gattttgtga aactgtggt gaagtttcaa aacaaaataa ccacttagaa 1560
 aaaagttaca cacaacaaac caaaagtgga tatctttttg gccagcactg 1610

<210> 11

<211> 1801

<212> DNA

<213> Drosophila hydei

<300>

<308> Z29098

<309> 1993-12-22

<313> (1)..(1801)

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(1787)

<223> /note="transposon"

<400> 11

taatatatat tatacgagcc ccaaccacta ttaattcgaa cagcatgttt tttttgcagt	60
gcgcaatggt taacacacta tattatcaat actactaaag ataacacata ccaatgcatt	120
tcgtctcaaa gagaatttta ttctcttcac gacgaaaaaa aaagttttgc tctatttcca	180
acaacaacaa aaatatgagt aatttattca aacggtttgc ttaagagata agaaaaaagt	240
gaccactatt aattcgaacg cggcgtaagc ttaccttaat ctcaagaaga gcaaaacaaa	300
agcaactaat gtaacggaat cattatctag ttatgatctg caaataatgt cacaatacag	360
catgcaaaaa aatttttagat tgctgcagat cagtagaagt ttagcaacga tggttcgtgg	420
taaacctatt tctaaagaaa tcagagtatt gattagggat tatittaaat ctggaaagac	480
acttacggag ataagcaagc aattaaattt gcctaagtcg tctgtgcatg gggtgataca	540
aattttcaaa aaaaatggga atattgaaaa taacattgcg aatagaggcc gaacatcagc	600
aataacaccc cgcgacaaaa gacaactggc caaaattgtt aaggctgac gtcgccaatc	660

tttgagaaat ttggcttcta agtggctgca gcaattggca aaactgtcaa gcgagagtgg	720
acgcgacaaa ttaaaaagta ttggatatgg tttttataaa gtatgttttg ttattacctg	780
tgcacgtac ccaataactt actcgtaatc ttactcgtag gccaaaggaaa aacccttgct	840
tacgcttcgt caaaaaaaga agcgtttgca atgggctcgg gaaaggatgt cttggactca	900
aaggcaatgg gataccatca tattcagcga tgaagctaaa ttgatgtta gtgtcggcga	960
tacgagaaaa cgcgatcc gtaagaggtc agaaacatac cataaagact gccttaaaag	1020
aacaacaaag tttcctgcga gcactatggg atggggatgt atgtctgcc aaggattagg	1080
aaaacttcat ttcatgaag ggacagttaa tgctgaaaaa tatattaata tttacaaga	1140
tagtttggtt ccatcaatac caaaactatt agattgcggg gaattcactt ttcagcagga	1200
cggagcatca tcgcacacag ccaagcgaac caaaaattgg ctgcaatata atcaaattga	1260
ggttttagat tggccatcaa atagtccaga tctaagccca attgaaaata tttggtggct	1320
aatgaaaaac cagcttcgaa atgagccaca aaggaatatt tctgacttga aaatcaagtt	1380
gcaagagatg tgggactcaa tttctcaaga gcattgcaaa aatttgtaa gctcaatgcc	1440
aaaacgagtt aaatgcgtaa tgcaggccaa gggcgacgtt acacaattct aatattaatt	1500
aaattattgt ttttaagtat atagtaaato acattacgcc gcgttcgaat taatagtgtt	1560
cacttttttc ttatctotta agcaaaccgt ttgaataaat tactcatatt tttgttggtt	1620
ttggaaatag agcaaaaact tttttttcgt cgtgaagaga ataaaattct ctttgagacg	1680
aaatgcattg gtatgtgta tcttttagtag tattgataat atagtgtgtt aaacattgcg	1740

cactgcaaaa aaaacatgct gttcgaatta atagtgggtg gggctcgtat attatatatt 1800

a

1801

<210> 12

<211> 1801

<212> DNA

<213> Drosophila hydei

<300>

<308> Z29102

<309> 1994-07-01

<313> (1).. (1801)

<220>

<221> misc_feature

<222> (15).. (1787)

<223> /note="transposon"

<400> 12

gttagcagct tctacgagcc ccaaccacta ttaattogaa cagcatgttt tttttgcagt 60

gcgcaatggt taacacacta tattatcaat actactaaag ataacacata ccaatgcatt 120

togtctcaaa gagaatttta ttctcttcac gacgaaaaaa aaagttttgc totatttcca 180

acaacaacaa aaatatgagt aatttattca aacggtttgc ttaagagata agaaaaaagt 240

gaccactatt aattcgaacg cggcgtaagc ttaccttaat ctcaagaaga gcaaaacaaa 300

agcaactaat gtaacggaat cattatctag ttatgatctg caaataatgt cacaatacag 360

catgcaaaaa aatttttagat tgctgcagat cagtagaagt ttagcaacga tggttcgtgg	420
taaacctatt tctaaagaaa tcagagtatt gattagggat tattttaaat ctggaaagac	480
acttacggag ataagcaagc aattaaattt gcctaagtcg tctgtgcatg gggtgataca	540
aattttcaaa aaaaatggga atattgaaaa taacattgcg aatagaggcc gaacatcago	600
aataacaccc cgcgacaaaa gacaactggc caaaattggt aaggctgato gtcgccaato	660
tttgagaaat ttggcttcta agtggtcgca gcaattggca aaactgtcaa gcgagagtgg	720
acgcgacaaa ttaaaaagta ttggatatgg tttttataaa gtatgttttg ttattacctg	780
tgcatcgtac ccaataactt actcgtaato ttactcgtag gccaaaggaaa aacccttgct	840
taogcttcgt caaaaaaaga agcgtttgca atgggctcgg gaaaggatgt ctgggactca	900
aaggcaatgg gataccatca tattcagcga tgaagctaaa tttgatgtta gtgtcggcga	960
tacgagaaaa cgcgtcatcc gtaagaggtc agaaacatac cataaagact gccttaaaag	1020
aacaacaaag tttcctgcga gcactatggt atggggatgt atgtctgcc aaggattagg	1080
aaaacttcat ttcatgaag ggacagttaa tgctgaaaaa tatattaata ttttacaaga	1140
tagtttggtg ccatcaatac caaaactatc agattgcggt gaattcactt ttcagcagga	1200
cggagcatca tcgcacacag ccaagcgaac caaaaattgg ctgcaatata atcaaatgga	1260
ggtttttagat tggccatcaa atagtcgaga tctaagocca attgaaaata tttgggtggc	1320
aatgaaaaac cagcttcgaa atgagccaca aaggaatatt tctgacttga aaatcaagtt	1380
gcaagagatg tgggactcaa tttctcaaga gcattgcaaa aatttggtta gctcaatgcc	1440

aaaacgagtt aaatgcgtaa tgcaggccaa gggcgacgtt acacaattct aatattaatt 1500
 aaattattgt ttttaagtatg atagtaaato acattacgcc gcgttcgaat taatagtgg 1560
 cacttttttc ttatctotta agcaaaccgt ttgaataaat tactcatatt tttgttggtg 1620
 ttggaaatag agcaaaaactt tttttttcgt cgtgaagaga ataaaattct ctttgagacg 1680
 aaatgcattg gtatgtgta tcttttagtag tattgataat atagtgtgtt aaacattgcg 1740
 cactgcaaaa aaaacatgct gttcgaatta atagtgggtg gggctcgtaa agctaactat 1800

a

1801

<210> 13
 <211> 1649
 <212> DNA
 <213> Haematobia irritans

<300>

<301> Robertson, H. M. and Lampe, D. J.

<302> Recent horizontal transfer of a mariner transposable element among

<303> Mol. Biol. Evol. 12 (5), 850-862 (1995)

<304> 12

<305> 5

<306> 850-862

<307> 1995

<308> U11641

<309> 1995-12-16

<313> (1).. (1649)

<300>

<308> U11641

<309> 1995-12-16

<313> (1).. (1649)

<220>

<221> source

<222> (188).. (1451)

<223> /transposon="mariner transposon"

<400> 13

aaaatatgtg attaccgtta tagcggaataa tatattcaga gagattagtt tactttaata 60

gcgtacataa agttttttga cctgattttt actctttctt cactattttg taaacactga 120

attaggattt gcgaatttat atggaaggaa atatctagaa caaacataaa caaagagata 180

ttgagagtaa catgttggct gataagtccc cggtttgaca ctagtattaa atgcatatta 240

tttttatata ggaccaacct tcaaatgatt cgtgtcaaaa ttgacgtca attagtttgt 300

gagagcaact tttgttattg tgaagaaaat ggaaaaaatt tcatttcgaa tttcgtgttt 360

tgataaaata ctgttttctg aagggaataa atgcggtgga agcaaaaagt tggcttgata 420

atgagtttcc ggactctgcc ccaaggaaat caataataat tgatttggtat gcaaaattca 480

agcgaggtga aatgagcacg gaggacggtg aacgcagtgg acgcccgaag gaggtgggta 540

ccgacgaaaa catcaaaaaa atccacaaaa tgattttgaa tgaccgtaaa atgaagtga 600

tcgagataac aaaggcctta aacatatcaa aggaacgtgt tggcatatc attcatcaat 660

atttgatat gcggaagctc tgtgcaaaat ggggtccgcg cgaactcaca ttgaccaaa 720

aacaacaacg tgttgatgat tctgagcggg gtttcagct gtttaactgt aatacacccg 780

agtttttccg tcgatatgta acaatggatg aaacatggct ccatcactac actcctgagt 840
 tcgatcaaca gtccgctgag tggacagcga ccggtgaacc gtctccgaag cgtggaaaga 900
 ctcaaaagtc cgctggcaaa gtaatggcct ctgttttttg gaatgcgcat ggaataattt 960
 ttatcgatta tcttgagaag gaaaaaacca tcaacagtga ctattatatg gcgttattgt 1020
 agcgtttgaa ggtcgaaatc gcggcaaaat ggccccatat gaagaagaaa aaagtgttgt 1080
 tcgaccaaga caatgcaccg tgccacaagt cagtaagaac gatggcaaaa attcatgaat 1140
 tgggcttcga attgcttccc caccactat attctccaga tctggcccc agcgaatttt 1200
 tcttgttctc agacctcaaa agggatgctc gcagggaaaa aatttggtg caatgaagag 1260
 gtaatcgccg aaactaaggc ctattttgag gcaaaaccgt aagagtacta ccaaatggt 1320
 atcaaaaaat tggaaggctg ttataatcgt ggtatcgctc ttgaaggga ctatgttgaa 1380
 taataaaaac gaattttgac aaaaatgtg ttttctttg ttagaccggg gacttatcac 1440
 ccaacctgtt aaaaactgtt actttttgtt aaagtaagtc agaataaaac aaatatttga 1500
 atttttggag gtgtacgtaa acttctttga ttactgtat atatttttaa gcttcacaat 1560
 aaagtacaca ctigttagagt taaaatcgtc tcgtcttctc ttttactaaa tacaacatgg 1620
 tgtcagaagg tgtgtgaagt ctaattaa 1649

<210> 14

<211> 1543

<212> DNA

<213> Chrysoperla plorabunda

<300>

<308> U11652

<309> 1995-12-16

<313> (1).. (1543)

<220>

<221> source

<222> (146).. (1442)

<223> /transposon="mariner transposon"

<400> 14

ccttaaattt atttgtattg atttgaagct taaaaaatgt atacaatttt aaagaaagct	60
gaaagtattc tgaactaac gtggagaatt tattacgaat ttttggtggt gattgtaatt	120
gottgcttaa tatcggctct ctgtatatta ggttggctga taagtcctcg gtctgacaca	180
tagatggcgt cgotagtatt aaatgcatat tatttttata tagtaccac cttcaaatga	240
ttcgtgtcaa aatttgacgt ctgtaagtca attagtttgt gagatagagc gtcttttgtg	300
aagcaacttt tgttatttg taaaaaatgg aaaaaaagga atttcgtgtt ttgataaaat	360
actgttttct gaagggaata aatacagtgg aagcaaaaac ttggcttgat aatgagtttc	420
cggactctgc ccagggaaa tcaacaataa ttgatttgta tgcaaaattc aagcgtgggtg	480
aaatgagcac ggaggacggt gaacgcagtg gacgcccga agaggtgggt accgacgaaa	540
acatcaaaaa aatccacaaa atgattttga atgaccgtaa aatgaagttg atcgagatag	600
cagaggcctt aaagatatca aaggaacgtg ttggtcatat cattcatcaa tatttggata	660
tgcggaagct ctgtgcaaaa tgggtgccgc gcgagctcac atttgaccaa aaacaacaac	720

gtgttgatga ttctgagcgg tgtttgcagc tgttaactcg taatacaccc gagtttttgc	780
gtcgatatgt gacaatggat gaaacatggc tccatcacta cactcctgag tccaaacgac	840
agtcggctga gtggacagcg accggtgaac cgtctccgaa gcgtggaaag actcaaaagt	900
ccgctggcaa agtaatggcc tctgtttttt tcgatgcgca tggaataatt tttatcgatt	960
atcttgagaa gggaaaaacc atcaacagtg actattatat ggcgttattg gagcgtttga	1020
aggtcgaaat cgcggcaaaa cggccccata tgaagaagaa aaaagtgttg ttccaccaag	1080
acaacgcacc gtgccacaag tcattgagaa cgatggcaaa aattcatgaa ttgggcttcg	1140
aattgcttcc ccaccaccg tattctccag atctggcccc cagcgacttt ttcttgttct	1200
cagacctcaa aaggatgctc gcagggaaaa aatttggctg caatgaagag gtgatcgccg	1260
aaactgaggc ctattttgag gcaaaaccga aggagtacta ccaaaatggt atcaaaaaat	1320
tggaaggctg ttataatcgt tgtatcgctc ttgaaggga ctatgttgaa taataaaaac	1380
gaattttcac aaaaaaatgt gtttttcttt gttagaccgg ggacttatca gccaacctgt	1440
tatcttgacg aaaaaatgaa tggtcgataa ataatgtgat gtgacctta ctgtgttcac	1500
ttgactggac gaaaccgtta tgatcaattt ggatgcctaa aac	1543

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☒ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.